

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND

KEEMIA INSTITUUT  
BIOORGAANILISE KEEMIA ÕPPETOOL

Annika Heinloo  
BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i RAKENDAMINE HETEROTRIMEERSETE  
G-VALKUDE UURIMISEKS

Magistritöö

Juhendajad: teadur Sergei Kopanchuk, PhD.,  
professor Ago Rinken, PhD, M.D.

TARTU 2015

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Signaali ülekanne .....	6
1.2. G-valk seotud retseptorid .....	7
1.2.1. Serotoniin ja serotoniini retseptorid .....	8
1.3. G-valgud.....	9
1.3.1. Bivalentsete metallikatioonide mõju G-valkude aktiivsusele .....	10
1.4. Meetodid ligand-membraanvalgu kompleksi uurimiseks.....	11
1.4.1. Radioaktiivsusel põhinevad meetodid .....	11
1.4.2. Fluorestsentsil põhinevad meetodid .....	12
1.4.3. Fluorestsentsanisotroopia muutuse määramine .....	13
1.4.4. Fluorestsentsmärgistatud ligandid .....	14
1.5. Rekombinantset ekspressioonisüsteemid valkude tootmiseks.....	16
1.5.1. Pungunud bakuloviiruste pinna tehnoloogia .....	17
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	19
2.1. Aparatuur ja töövahendid .....	19
2.2. Materjalid .....	19
2.3. Sf9-rakkude kasvatamine .....	20
2.4. Rekombinantsete bakuloviiruste paljundamine.....	20
2.5. 5-HT <sub>1A</sub> retseptori ja G-valgu alaühikute koekspressioon Sf9-bakuloviirus süsteemis...	21
2.6. Fluorestsentsanisotroopia määramine .....	21
2.6.1. BODIPY-FL- ja BODIPY-TR-märgistatud GTPγS-i sidumisomaduste võrdlemine....	22
2.6.2. Nukleotiidide seostumise uurimine Gai-valke sisaldavatele bakuloviirusosakestele ...	23
2.6.3. BODIPY-TR-GTPγS-i seostumis- ja dissotsiatsioonikineetika uurimine .....	23
2.6.4. Katsed BODIPY-FL-märgistatud NAN-190-ga.....	23
2.7. Andmeanalüüs.....	24
3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	26
3.1. BODIPY-FL-GTPγS-i ning BODIPY-TR-GTPγS-i sidumisomaduste võrdlemine bakuloviirusosakestele.....	26
3.2. BODIPY-TR-GTPγS-i seostumis- ja dissotsiatsioonikineetika määramine Mg <sup>2+</sup> - või Mn <sup>2+</sup> - ioonide juuresolekul .....	28

3.3. Nukleotiidide sidumisasiinsuste määramine bakuloviirusosakestes ekspresseeritud Gai- valkudele .....	30
3.3.1. 5-HT <sub>1A</sub> retseptori agonisti ja antagonistide efekt nukleotiidide seostumisele .....	31
3.4. 5-HT <sub>1A</sub> retseptori ekspressiooni kontrollimine BODIPY-FL-NAN-190-ga.....	31
3.5. GTPγS-i mõju 5-HT <sub>1A</sub> retseptori agonisti seostumisele .....	32
KOKKUVÕTE.....	34
TÄNUAVALDUSED .....	35
KASUTATUD KIRJANDUS .....	36
SUMMARY .....	40

## KASUTATUD LÜHENDID

5-HT – serotoniin, 5-hüdroksütrüptamiin

5-HT<sub>1A</sub> – serotoniini 1A retseptor

8-OH-DPAT – 8-hüdroksü-2-(di-n-propüülamino)tetraliin

ATP – adenosiintrifosfaat

BV – bakuloviirus

BVSD – pungunud bakuloviiruste pinna tehnoloogia (*ingl. k. Baculovirus Surface Display*)

cAMP – tsükliline adenosiinmonofosfaat

DMSO – dimetüülsulfoksiid

EC<sub>50</sub> – ligandi kontsentratsioon, mis kutsub esile 50% maksimaalsest vastusest

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

FA – fluorestsentsanisotroopia

FRET – Förster'i/fluorestsents resonantsenergia ülekanne

GDP – guanosiindifosfaat

GEF – guaniinukleotiidide vahetusfaktor

GPCR – G-valk seotud retseptor

G-valk – guaniinukleotiide siduv regulaatorvalk

GTP – guanosiintrifosfaat

GTPγS – guanosiin-5-O-(γ-tio) trifosfaat

IC<sub>50</sub> – ligandi kontsentratsioon, mille juures on inhibeeritud 50% algsest vastusest

ivp – nakatusvõimeline viirusosake

MOI – nakatuskordsus ehk viirusosakeste osakaal rakkude suhtes

PI-PLC – fosfoinositiid-spetsiifiline fosfolipaas C

Sf9 – *Spodoptera frugiperda* 9 rakuliin

WAY 100635 – N-(2-(4-(2-metoksüfenüül)-1-piperasiinüül)etüül)-N-(2-püridinüül) tsükloheksaan karboksamiin

## SISSEJUHATUS

G-valk seotud retseptorid on inimorganismis tähtsad molekulaarlülid, millel on närvisignaali ülekandes suur roll. Väärtalitlused antud signaaliülekannetes põhjustavad erinevaid tervisehäireid ja tõsiseid haigusi, mistõttu on G-valk seotud retseptorid märklauaks ligi pooltele turulolevatest retseptiravimitest.

Närvisignaali ülekandemehhanismide uurimisel ja ravimkandidaatide sõelumisel on lisaks ligandi afiinsusele tähtis tema poolt esilekutsutav vastus. Vastuse määramisel on oluliseks etapiks membraanis aktiveeritav G-valk, kuid signaaliradasid on enamasti sekundaarsete virgatsainete tasemel uuritud. Käesoleva töö üldiseks eesmärgiks on G-valkude regulatsiooni iseloomustamine, mis on võtmeetapp signaaliraja aktiveerimisel. Täpsemalt keskendutakse inhibitoorsete G-valkude uurimisele.

Viimastel aastatel on turule saabunud uudseid fluorestsentsmärgistatud ligande ja nukleotiide, mida on lisaks GPCR-dele võimalik rakendada ka G-valkude uurimiseks. Antud töös rakendatakse BODIPY-TR-märgistatud GTP $\gamma$ S-i, et fluorestsentsanisotroopia määramise teel G<sub>i</sub>-valkude regulatsioonimehhanisme uurida. Sealjuures rakendatakse retseptor-G<sub>i</sub>-valgu kompleksi ekspresseerimiseks uudset pungunud bakuloviiruste pinna tehnoloogiat.

Retseptor-sõltuva nukleotiidi sidumise regulatsiooni uurimine G-valgule võiks anda uude metoodika ligandide bioloogilise aktiivsuse määramiseks kiirsõelumissüsteemides. Antud töös uuritakse retseptori ja G-valgu vahelisi interaktsioone, määrates retseptori aktivatsiooni mõju G-valgu regulatsioonimehhanismile.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Signaali ülekanne

Rakkude võime signaale vastu võtta ja töödelda on üks elu alustalasid. Erinevate funktsioonidega rakud vahetavad omavahel erinevaid signaale. Need signaalid on informatsioon, mis detekteeritakse spetsiifiliste retseptorite poolt ja teisendatakse rakuliseks vastuseks, see hõlmab endas enamasti keemilist protsessi. Sellist informatsiooni teisendamist nimetataksegi signaali ülekandeks. (Lehninger *et al.* 2005)

Signaali ülekande spetsiifilisuse tagab retseptori- ja signaalimolekuli omavaheline sobivus. Kui signaaliraja käivitajad ehk virgatsained võivad olla väga erinevad, siis üldine mehhanism jääb samaks:

- signaal aktiveerib retseptori;
- toimub signaali ülekanne raku sisse;
- rakk genereerib vastuse signaalile:
  - muutus raku metaboolses aktiivsuses
  - signaali edasikandmine
- signaali pidurdamine. (Lehninger *et al.* 2005)

Virgatsainete hulka kuulub väga palju erinevaid ühendeid. Klassikaliste virgatsainetena võib näiteks tuua väikesed molekulid nagu atsetüülkoliin, noradrenaliin ja dopamiin. Glutamaat (peamine eksitatoorne virgatsaine ajus) ning  $\gamma$ -aminovõihape (GABA) ja glütsiin (inhibitoorsed virgatsained) on aminohapped, mis osalevad mitmetes metaboolsetes tsüklites. Samuti võivad virgatsainete funktsioone täita peptiidid, valgulised ja steroidsed hormoonid, lipiidid jne. Olenevalt sellest kas virgatsaine aktiveerib, blokeerib või inhibeerib retseptori, jagunevad need vastavalt agonistideks, antagonistideks ja pöördagonistideks. (Brady *et al.* 2012)

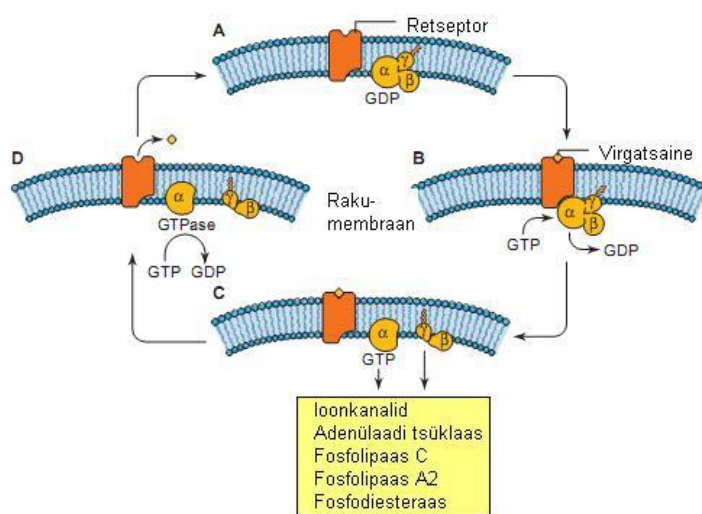
Retseptorid on jagatud nelja rühma: ligand-seotud ioonkanalid, ensüümretseptorid, transkriptsiooni reguleerivad retseptorid ja G-valk seotud retseptorid (GPCR – *G protein-coupled receptor*). Ligand-seotud ioonkanalid on membraansed valgud, mis virgatsaine seostumisel avanevad ning teatud ioone (näiteks  $\text{Na}^+$  ja  $\text{K}^+$ ) läbi rakumembraani lasevad. Teine põhiline retseptorite klass ehk ensüümretseptorid aktiveeritakse ligandi seostumisel rakuvälisesse sidumistaskusse, mis omakorda aktiveerib rakusisese katalüütilise funktsiooni. Enimlevinud ensüümretseptorid on retseptor-türosiinkinaasid, mis reguleerivad näiteks rakkude jagunemist ja diferentseerumist. (Brady *et al.* 2012) Raku sees paiknevad

transkriptsiooni reguleerivad retseptorid reageerivad steroidsetele ja türoidsetele hormoonidele ning on võimelised DNA-ga seostuma. Seega reguleerivad antud retseptorid geeniekspressiooni, kontrollides selle käigus organismi arengut ning metabolismi. (Jin ja Li; 2010) Käesolevas töös keskendutakse aga G-valk seotud retseptoritele, mis on elusorganismides enim levinud retseptorite klass (Brady *et al.* 2012).

## 1.2. G-valk seotud retseptorid

G-valk seotud retseptorid on seitsme transmembraanse heeliksiga valgud, mis edastavad signaali raku G-valgu aktiveerimisega. GPCR-e aktiveerivad paljud erinevad signaalid, näiteks valgus, lõhnamolekulid, peptiidid ja mittepeptiidid virgatsained, steroidid ja valgulised hormoonid ja lipiidid. GPCR-d vastutavad mitmete füsioloogiliste protsesside eest nagu rakkude vaheline kommunikatsioon, närvisignaali ülekanne, hormonaalne käitumine. (Brady *et al.* 2012). Häired nendes signaaliradades võivad põhjustada mitmeid tervisehäireid. Kuna läbi GPCR-de saab reguleerida paljusid rakulisi funktsioone, on need valgud sihtmärgiks väga paljudele turulolevatele retseptiravimitele. (Rosenbaum *et al.* 2009)

GPCR-d on seotud guaniini nukleotiide siduvate heterotrimeersete G-valkudega. G-valgud on molekulaarlülid, mis käivitavad G-valk seotud retseptorite rakuvälise aktiveerimise tagajärjel rakusiseses signaalirajad. Agonisti seondumisel GPCR-i rakuvälisesse sidumistaskusse muutub retseptori konformatsioon, mille tulemusel algatatakse G-valgu aktivatsioonitsüklil (Joonis 1). (Oldham ja Hamm 2008)

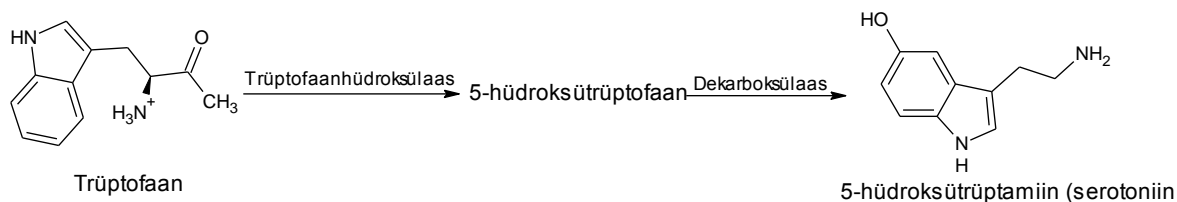


**Joonis 1.** Heterotrimeerse G-valgu aktivatsioonitsüklil (Brady *et al.* 2012)

Aktiveeritud retseptorid katalüüsivad GDP vabanemist ning GTP seondumist  $G\alpha$  alaühikule. GTP seostumine tekitab konformatsioonilise muutuse G-valgus, mille tagajärjel eraldub  $\alpha$ -alaühik  $\beta\gamma$ -dimeerist. (Oldham ja Hamm 2008)

### 1.2.1. Serotoniin ja serotoniini retseptorid

Serotoniin (5-HT ehk 5-hüdroksütrüptamiin) on üks levinumaid virgatsaineid kesknärvisüsteemis, mida seostatakse paljude erinevate ajufunktsioonidega, sealhulgas agressiivsuse, ärevuse, sõltuvushäirete, söömisharjumuste, mälu, tuju, sotsiaalse käitumise reguleerimisega ja palju muuga. Serotoniin sünteesitakse ajus L-trüptofaanist ensüümi trüptofaanhüdroksülaasi toimetel (Joonis 2). Serotonergilise süsteemi väärtalitlusi seostatakse mitmete tervisehäiretega, näiteks depressiooni, skisofreenia, ärevushäirete, migreeni, kõrge vererõhu ja söömishäiretega. (Pytliak *et al.* 2011)



**Joonis 2.** Serotoniini süntees ajus. (Pytliak *et al.* 2011)

Viimase 25 aasta jooksul on identifitseeritud 7 erinevat serotoniini 5-HT retseptorite alagruppi, millest enamik liigituvad G-valk seotud retseptorite alla. Vaid 5-HT<sub>3</sub> alagrupi retseptorid ei kuulu G-valk seotud retseptorite perekonda. Antud juhul on tegemist ligand-seotud ionkanalitega. (Hoyer *et al.* 2002)

5-HT<sub>1</sub> retseptorite alagrupp koosneb viiest alatüübist: 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1F</sub> ja 5-HT<sub>1H</sub>. Need retseptorid on üldiselt seotud G<sub>i</sub>/G<sub>0</sub>-valkudega, mille aktiveerimisel inhibeeritakse ensüüm adenülaadi tsüklaas (AC - *adenylyl cyclase*), mis katalüüsib tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (cAMP) moodustumist adenosinotriifosfaadist (ATP). 5-HT<sub>1A</sub> retseptor on kõige levinum serotoniini retseptor (Mestikawy *et al.* 1991). Ajus esinevad 5-HT<sub>1A</sub> retseptorid nii autoreseptoritena kui ka postsünaptiliste retseptoritena. Selle retseptori talitlust seostatakse erinevate käitumuslike ja söömisharjumustega. 5-HT<sub>1A</sub> väärtalitlused võivad põhjustada ärevushäireid ja depressiooni ning mõned antud retseptori osalised agonistid



(näiteks buspiroon ja gepiroon) on kasutusel ärevuse ja depressiooni ravimitena. (Mestikawy *et al.* 1991, Pytliak *et al.* 2011)

Uurimistöö antud retseptori ümber on pidevas arengus ning ka meie töörühmas on 5-HT<sub>1A</sub> retseptoriga ja inhibiitorsete G-valkudega seotud signaaliülekanne mehhanisme uuritud (Parkel *et al.* 2011; Tõntson *et al.* 2014). Sellest tulenevalt keskendub ka käesolev töö just selle retseptoriga seotud signaalirajale.

### 1.3. G-valgud

G-valgud on guaniini nukleotiide siduvad regulaatorvalgud, mis kannavad rakku tulevaid signaale üle raku sisemusse. G-valgud jagunevad kahte suurde rühma: monomeersed ning heterotrimeersed G-valgud. (Oldham ja Hamm 2008) Monomeersed G-valgud ehk väiksed GTP-aasid paiknevad raku tsütosoolis ning suudavad endaga siduda ning hüdrolyüsida guanosüintri-fosfaati (GTP) guanosüindifosfaadiks (GDP). Väiksed GTP-aasid reguleerivad mitmeid rakulisi funktsioone, sealhulgas rakkude jagunemist, diferentsieerumist ja liikumist. (Goitre *et al.* 2014)

Retseptoritega on aga seotud teine rühm ehk heterotrimeersed G-valgud. Heterotrimeersed G-valgud koosnevad kolmest alaühikust:  $\alpha$  (40-45 kDa),  $\beta$  (~36 kDa) ja  $\gamma$  (7-8 kDa).  $\alpha$ -alaühiku võib jagada kaheks domeeniks: Ras-tüüpi GTP-aas domeeniks, mis on struktuuri poolest homoloogiline monomeerse G-valguga ning spiraalseks domeeniks. GTP-aasi domeen hüdrolyüsib GTP-d ning seob endaga  $\beta\gamma$ -dimeeri ja GPCR-i. GDP ja GTP seostumisel  $\alpha$ -alaühikule moodustuvad vastavalt inaktiivne ja aktiivne konformatsioon. (Oldham ja Hamm 2008)

$\alpha$ - ja  $\gamma$ -alaühikud on posttranslatoorselt modifitseeritud ja omavad lipiidset „ankrut“, mis kinnitab need alaühikud raku plasmamembraani külge.  $\beta$ - ja  $\gamma$ -alaühikud moodustavad omavahel tugeva dimeeri, mis füsioloogilistes tingimustes ei dissotsieeru. Heterotrimeerse G-valgu  $\beta$ -alaühikul on teadaolevalt vähemalt 6 ning  $\gamma$ -alaühikul vähemalt 12 alatüüpi, seega võib nende erinevate alatüüpide vahel moodustuda palju erinevaid dimeerseid kombinatsioone. Lisaks on teada vähemalt 21  $\alpha$ -alaühiku tüüpi – seetõttu võib nende erinevate alatüüpide kombineerimisel teoreetiliselt moodustuda väga suur arv erinevaid heterotrimeerseid komplekse. (Oldham ja Hamm 2008; Roberts ja Waelbroeck 2004)

Heterotrimeersed G-valgud jagunevad  $\alpha$ -alaühiku struktuuri ja aktiveeritava signaaliraja järgi nelja alagruppi:  $G_{\alpha_s}$ ,  $G_{\alpha_i}$ ,  $G_{\alpha_q}$  ja  $G_{\alpha_{12/13}}$ .  $G_s$  perekond aktiveerib adenülaadi tsüklaasi, mis katalüüsib tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (cAMP) teket adenosintrifosfaadist (ATP);  $G_i$  perekond inhibeerib adenülaadi tsüklaasi ja pinge-sõltuvaid  $Ca^{2+}$  kanaleid, aktiveerib kindlat tüüpi  $K^+$  kanalit ja fosfodiesterase;  $G_q$  perekond aktiveerib fosfoinositiid-spetsiifilist fosfolipaas C-d (PI-PLC);  $G_{12}$  perekond aktiveerib valkude rühma Rho-GEF (Rho-guaniinukleotiidide vahetusfaktor). (Dhanasekaran *et al.* 1998) Käesolevas töös uuritakse  $G_i$  perekonda kuuluvaid valke:  $G_{\alpha_{i1}}$ ,  $G_{\alpha_{i2}}$  ja  $G_{\alpha_{i3}}$ , mis on antud juhul seotud 5-HT<sub>1A</sub> retseptoriga. Erinevad GPCR perekonna valgud aktiveerivad G-valke sarnase mehhanismiga, kusjuures paljud erinevad retseptorid aktiveerivad sama G-valgu alatüüpi. Viimasel ajal on aga avastatud, et sõltuvalt ligandist võib retseptor valida aktiveeritava G-valgu ja sellega ka edasise signaaliraja. Juhul kui retseptor seostub mitteselektiivselt erinevate G-valgu alatüüpidega, siis üritavad need G-valgud konkureerivalt retseptor-agonist kompleksiga seostuda. Selle tulemusena võivad retseptorid paralleelselt mitme G-valgu alatüübiga seostuda, mis põhjustab agonisti efekti vähenemist ühe kindla G-valgu alatüübi vahendatud signaalirajas. Kui aga retseptor on kindla G-valgu alatüübi suhtes selektiivne, siis ei suuda teised alatüübid seostumisel konkureerida ning agonisti efekt on sellevõrra suurem ja spetsiifilisem. (Roberts ja Waelbroeck 2004)

### 1.3.1. Bivalentsete metallikatsioonide mõju G-valkude aktiivsusele

Varasemalt on kindlaks määratud, et guanosiini nukleotiidid on füsioloogilistes tingimustes kompleksis bivalentsete metallikatsioonidega (enamjaolt  $Mg^{2+}$ ga). Nendel katsioonidel on G-valgu tsükli aktivatsiooni ja deaktivatsiooni reguleerimisel oluline roll. Täpsemalt mõjutavad bivalentsed katioonid GTP hüdrolyüsi ja nukleotiidide vahetust  $\alpha$ -alaühikul.  $Mg^{2+}$  mängib kaudselt olulist rolli ka retseptor-G-valgu interaktsioonil, kuna  $Mg^{2+}$  soodustab GDP vabanemist G-valgu  $\alpha$ -alaühikult. Nukleotiidivaba G-valk on aga vajalik selleks, et agonist seostuks retseptorile kõrge afiinsusega. (Parkel *et al.* 2011, Malarkey *et al.* 2008)

$G_i$ -valkude  $\alpha$ -alaühikutel on kaks bivalentsete katsioonide sidumiskohta: üks millimolaarse, teine nanomolaarse afiinsusega. Millimolaarse afiinsusega sidumine on seotud GDP/GTP vahetumisega ja agonisti seostumisega retseptorile, nanomolaarse afiinsusega sidumine aga GTP hüdrolyüsiga. Varasemalt on täheldatud, et  $Mn^{2+}$  on võimeline mõlemas sidumiskohas

Mg<sup>2+</sup> asendama. (Freisinger ja Sigel 2007, Malarkey *et al.* 2008, Parkel *et al.* 2010). Käesolevas töös uuritakse Mg<sup>2+</sup> ja Mn<sup>2+</sup> katioonide mõju nukleotiidide seostumisele G-valgule.

#### 1.4. Meetodid ligand-membraanvalgu kompleksi uurimiseks

Membranvalkudel on farmaatsiatööstuses oluline roll. Membranvalkude hulka kuuluvad GPCR-d on sihtmärgiks ligikaudu 50%-le turulolevatest retseptiravimitest. Seetõttu on GPCR-i aktivatsiooni poolt algatatud signaaliradade uurimise meetodid ning ligandide sõeluuringud ravimiarenduse tähelepanu keskmes. Membranvalkudega seonduvate ühendite uurimisel on ajalooliselt tähtsal kohal radioligandi sidumise meetodid, kus kasutatakse membraanvalke sisaldavaid rakumembraane. Sellisel teel määratud ühendite sidumisafiinsused ei näita aga, kuidas käitub ühend füsioloogilistes tingimustes ja kas tegemist on agonisti või antagonistiga. Viimaste aastakümnete jooksul on aga arendatud signaali- ja rakupõhiseid funktsionaalseid meetodeid. Ideaalne meetod membraanvalkude uurimise jaoks peaks olema lihtne, mitteradioaktiivne, homogeenne ja kergesti automatiseeritav. (Hill *et al.* 2010)

Ligandide sõeluuringutel on üldiselt tähelepanu pööratud ligand-GPCR kompleksile või sekundaarsetele virgatsainetele, tagaplaanile on jäänud aga G-valgud ja nende regulatsioonimehhanismid. Fluorestsentsil ja radioaktiivsusel põhinevate meetodite rakendamine G-valgu regulatsioonimehhanismide uurimiseks annab signaaliülekande mehhanismide kohta uudset informatsiooni. Üheks võimaluseks nukleotiidide sidumise uurimiseks G-valgule on kasutada kas radioaktiivselt- või fluorestsentsmärgistatud nukleotiide.

##### 1.4.1. Radioaktiivsusel põhinevad meetodid

Radioligandi sidumismeetod koos kiirfiltrimise etapiga on olnud levinuim meetod ühendite võimekuse ja selektiivsuse karakteriseerimiseks membraansete sihtvalkude suhtes. Antud meetodiga saab lisaks ligandide sidumisafiinsustele määrata ka valkude hulka membraanis ning ligandide sidumiskineetikat. Sidumisafiinsuste määramine antud meetodiga põhineb membraanpreparaatide inkubeerimisel radioligandiga teise, konkureerivalt seostuva ühendi

juuresolekul. Pärast inkubatsiooni etappi pestakse vaba radioligand läbi klaaskiudfiltrite maha ning valkudega seostunud radioligandi hulk määratakse stsintillatsiooniloenduriga. Etapid teostatakse üldiselt manuaalselt, mis teeb meetodi keerukaks ning aeganõudvaks. (Wong 2006)

GTP $\gamma$ S sidumise meetodid mõõdavad otseselt G-valgu guaniini nukleotiidi vahetust. Tavaliselt mõõdetakse pärast agonisti seondumist mitte-hüdrolüüsuva GTP analoogi akumulatsiooni (nt [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S). Erinevalt retseptori sidumiskatses eristab GTP $\gamma$ S analüüs täis- ja osalisi agoniste, neutraalseid antagonistide, pöördagoniste ja allosteerilisi regulatsioone. Reaalsuses on see meetod rakendatavam selliste signaaliradade uurimisel, mis on seotud  $G_{\alpha_{i/o}}$ -ga, mis on paljudes rakkudes levinuim G-valk ja omab kiiremat GDP-GTP vahetust kui teised G-valgud. Vaatamata sellele on [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S sidumiskatsed kasutatavad ka  $G_s$  ja  $G_q$  perekonna G-valkude puhul, eriti kunstliku ekspressioonisüsteemi rakendamisel. Selle meetodi puuduseks on filtreerimise etapp vaba ja seotud [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S-i eraldamiseks, mis limiteerib meetodi läbilaskevõimet. (Zhang *et al.* 2012)

Üheks levinud meetodiks ligandi seostumise uurimiseks GPCR-le on sekundaarse virgatsaine cAMP-i akumulatsiooni määramine elusrakus. Otsesem viis cAMP-i akumulatsiooni määramiseks on radioaktiivselt märgistatud molekulide kasutamine. Terves rakus on see kõige paremini saavutatav adeniini eelmärgistamisel triitiumiga ( $^3$ H). Adeniin muutub cAMP-iks, mis sisaldab oma struktuuris endiselt triitiumi aatomit. Seetõttu saame detekteerida  $^3$ H-cAMP-i akumulatsiooni. Et eraldada  $^3$ H-cAMP teistest triitiumiga märgistatud adeniini derivaatidest, kasutatakse Dowex/Alumina kolonni.  $^3$ H-cAMP-i kineetika uuringud on andnud olulist informatsiooni agonisti aktiivsustaseme kohta erinevate GPCR-de korral ja andnud informatsiooni erilaadse kineetika kohta rakusisese cAMP-i akumulatsioonil ja cAMP-i rakust väljavoolul. Probleem, mis on alati antud meetodi korral tõstatatud, on see, et tegemist on pigem cAMP-i ringluse kui cAMP-i absoluutse taseme mõõtmisega. (Hill *et al.* 2010)

#### **1.4.2. Fluorestsentsil põhinevad meetodid**

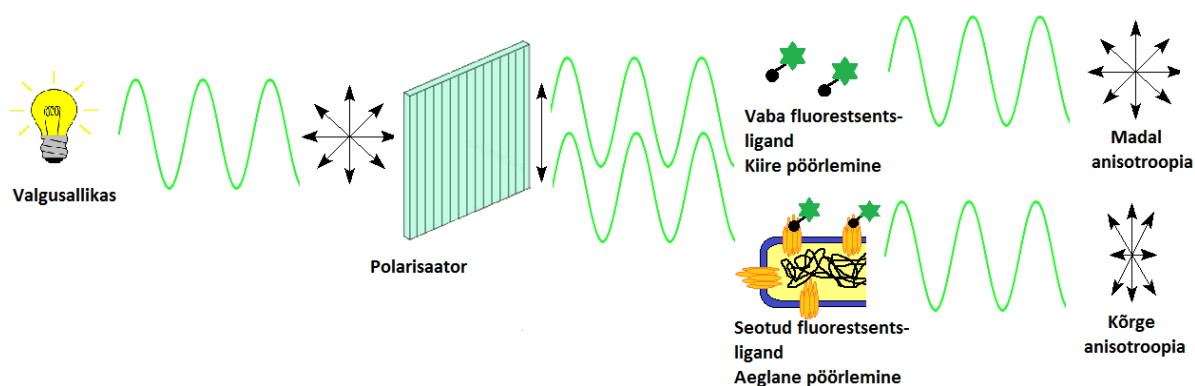
Uudsete molekulaarselt eredate fluorestsentsmärgiste turuletulek on radioaktiivsusel põhinevad meetodid tagaplaanile surunud ning viinud uute alternatiivsete meetodite tekkeni (Chen *et al.* 2012). Erinevate fluorestsentsmeetodite kiire edasiarendus, spetsiifiliste fluorestsentsmärgiste väljatöötamine ning uudne aparatuur on antud tüüpi meetodid tänapäeval vägagi atraktiivseks muutnud. Nende omaduste tõttu on ka elusrakkudes võimalik

määrata muutusi fluorestsentsis ning eristada signaal taustafluorestsentsist. (Yengo ja Berger 2010) Erinevate fluorestsentsil põhinevate meetodite alla kuuluvad näiteks fluorestsentspolarisatsiooni (FP) meetodid, fluorestsentsmikroskoopia, fluorestsentsi resonantsenergia ülekanne (FRET) ning fluorestsentsi korrelatsioonspektroskoopia (FCS) (Sridharan *et al.* 2014). Antud töös kasutatakse ligandi seostumisel indutseeritava fluorestsentsanisotroopia muutuse määramisel põhinevat meetodit, mis põhineb fluorestsentspolarisatsiooni määramisel.

### 1.4.3. Fluorestsentsanisotroopia muutuse määramine

Väikse molekulmassiga ligandid pöörlevad lahuses kiiresti. Kõrgmolekulaarsete valkudega seostudes väheneb pöörlemisvabadus aga märgatavalt. Selline muutus vaba ja seotud ligandi pöörlemisvabaduses ongi fluorestsentsanisotroopia meetodi alus ligandide sidumise määramisel. (Weber 1952)

Meetod põhineb nähtusel, et lineaarse polariseeritud valgusega ergastamisel emiteerivad valguga seotud ligandid ergastava valguse tasandiga võrreldes samasuunaliselt polariseeritud valgust, seostumata ligandid emiteerivad aga depolariseeritud valgust. Ligandide seostumisel suurtele valkudele väheneb nende pöörlemisvabadus, mis põhjustab emiteeritud fluorestsentsi polarisatsiooni suurenemist, vaba ligand emiteerib aga depolariseeritud kiirgust. Seda saab mõõta reaajas fluorestsentsanisotroopia signaalina: vaba ligandi anisotroopia on madal, valguga seotud ligandi anisotroopia aga kõrge (Joonis 3). (Weber 1952)



**Joonis 3.** Fluorestsentsanisotroopia (FA) sõltuvus fluorestsentsligandi pöörlemisvabadusest

Anisotroopia ( $r$ ) on defineeritud kui paralleelselt ( $I_{\parallel}$ ) ja perpendikulaarselt ( $I_{\perp}$ ) polariseeritud fluorestsentsi intensiivsuste vahe, mis on jagatud totaalse fluorestsentsi intensiivsusega (Valem 1).

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (1)$$

Meie töörühmas on fluorestsentsanisotroopia meetodit kasutatud ligandide sidumisomaduste määramiseks näiteks puhastatud valkudele (Tõntson *et al.* 2012) kui ka bakuloviirusosakestele (Veiksina *et al.* 2014). Fluorestsentsanisotroopial põhinevat sidumist saab mõõta tasakaalulistes tingimustes ja see ei nõua vaba ligandi eraldamist katsesüsteemist. Mõõtmisi saab teostada fluorimeetri või fluorestsentsi plaadilugejaga. (Sridharan *et al.* 2014)

Meetodi teeb keerukamaks see, et ligandi anisotroopia märgatavaks muutuseks on vajalik, et suur hulk ligandist seostuks sihtvalgule. Seetõttu on vajalik, et valkude kontsentratsioon lahuses oleks samas suurusjärgus kui ligandi kontsentratsioon ja see peaks ühtlasi olema võrreldav ka ligandi dissotsiatsioonikonstandi suurusjärguga. Niivõrd kõrgeid membraanvalgu kontsentratsioone võib aga paljude valgupreparaatide puhul olla raske saavutada. Samuti võib mõningat tüüpi valgupreparaatide puhul probleemiks osutuda kõrge taustafluorestsents. Nende probleemide osaliseks vältimiseks teostatakse fluorestsentsanisotroopia määramised tihtipeale konkureeriva sidumise tingimustes, kus märgistamata ligand tõrjub fluorestsentsmärgistatud ligandi välja. (Sridharan *et al.* 2014)

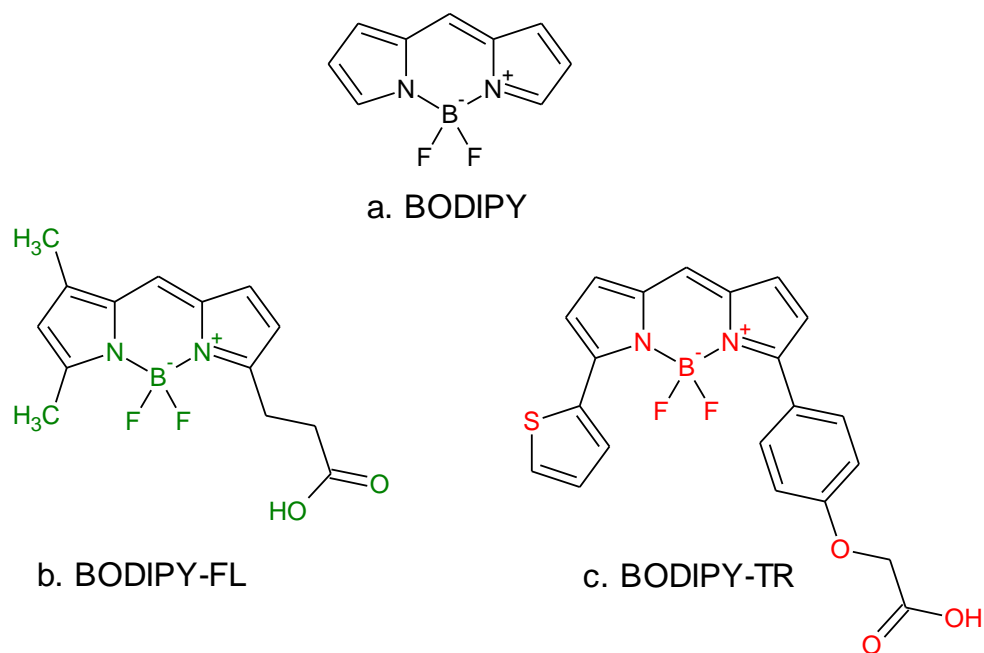
#### 1.4.4. Fluorestsentsmärgistatud ligandid

Enamik membraanvalkude ligandidest ei ole loomupäraselt fluorestseeruvad, seetõttu on fluorestsentsil põhinevate meetodite rakendamisel membraanvalkude uurimiseks üldiselt vajalik ligandide märgmistamine fluorestsentsmärgisega. Orgaanilised fluorofoorid võivad ligandidega seostuda kas kovalentselt või mittekovalentselt ning olenevalt sellest, millist märgist kasutatakse, võib tekkinud konjugaatide või komplekside fluorestsentsi lainepikkus ulatuda madalast väga kõrgele. Bioloogilistes rakendustes on olulisel kohal just kõrgema ergastus- ja emissiooni lainepikkusega fluorofoorid. (Goncalves 2009)

Fluorestsiiin on üks vanimaid ja enimkasutuselolevaid fluorestsentsmärgiseid, antud märgis on aga vastuvõtlik fotobleekimisele ning tema fluorestsents on keskkonna pH suhtes tundlik,

seega püsib stabiilsemate määrgiste arendus pidevas huviorbiidis. Lisaks fluorestsiniinile ja fluorestsiniini derivaatidele kuuluvad populaarsemate fluorestsentsmäärgiste hulka ka näiteks biarseensed fluorofoorid (FIAsH, F2FIAsH), rodamiinid, boor-dipürometeeni (BODIPY) analoogid ja tsüaniinid. (Goncalves 2009) Käesolevas töös kasutatakse BODIPY analoogidega määrgistatud ligande.

BODIPY (Joonis 4.a) analoogid on väga mitmekülgsed fluorofoorid, mis on kasutusel paljudes bioloogilistes rakendustes. BODIPY molekuli fluorestsentsi ergastus- ja emissiooni alasid on erinevate modifikatsioonidega lihtne varieerida. BODIPY analoogidel on üldiselt kõrge molaarne neeldumiskoeffitsient, kõrge kvantsaagis ( $\Phi_F \approx 1.0$ ) ning kõrge fotostabiilsus. (Loudet ja Burgess 2007, Goncalves 2009)



**Joonis 4.** BODIPY molekuli ja kahe BODIPY analoogi struktuurid

Antud töös kasutatakse kahte BODIPY analoogi: BODIPY-FL ning BODIPY-TR (vastavalt Joonis 4.b ja 4.c). Bodipy-FL ( $\lambda_{\text{abs}}=503$  nm ja  $\lambda_{\text{em}}=512$  nm) on fluorestsiniiniga sarnaste omadustega roheline spektriline fluorestsentsmäärgis. Kõrge neeldumiskoeffitsiendi, kvantsaagise ja pika fluorestsentsi eluea ( $\sim 5$  ns) tõttu on BODIPY-FL fluorestsentspolarisatsioonil põhinevatel analüüsidel hästi rakendatav. BODIPY-TR ( $\lambda_{\text{abs}}=592$  nm ja  $\lambda_{\text{em}}=618$  nm) on punase spektriline fluorestsentsmäärgis, mille fotofüüsikalised

omadused on sarnased BODIPY-FL märgisega. (The Molecular Probes® Handbook | Life Technologies)

Varasemalt on meie töörühmas  $G_{\alpha i}$ -valkude uurimisel kasutatud BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S-i (Tõntson *et al.* 2012). Käesolevas töös on kasutusse võetud aga BODIPY-TR-ga märgistatud GTP $\gamma$ S. 5-HT $_{1A}$  retseptori ekspressiooni kontrollimiseks ja uurimiseks kasutatakse BODIPY-FL-ga märgistatud NAN-190, mis on presünaptiliste 5-HT $_{1A}$  retseptorite osaline agonist ning postsünaptiliste retseptorite antagonist (Wesolowska *et al.* 2002).

### 1.5. Rekombinantsed ekspressioonisüsteemid valkude tootmiseks

Suurem osa membraanvalke esinevad looduslikus koes liiga madalatel kontsentratsioonidel, et neid fluorestsentsil põhinevate meetoditega uurida, seega on tarvis luua kunstlikke üleekspresseerimise süsteeme. Raku lipiidides kaksikkihis paiknevate valkude struktuur ja funktsioonid sõltuvad interaktsioonidest ümbritsevate lipiididega, mis stabiliseerivad membraanvalke ning loovad nende ümber võre. Membraanvalkude rekombinantne ekspressioon loob toodetava valgu jaoks sobiva keskkonna. (He *et al.* 2014) Tüüpilisemad süsteemid valkude üleekspresseerimiseks on näiteks *Escherichia coli* bakterid, pärmid ning bakuloviirustega nakatatud putuka- või imetajarakud. (Masotte 2003)

*Escherichia coli* bakterid on atraktiivne ekspressioonisüsteem, sest neid on lihtne paljundada ning odav kasvatatada. Sellel süsteemil on aga prokarüootse päritolu tõttu omad puudujäägid. (Masotte 2003). Varasemad uuringud on näidanud, et erinevat tüüpi valkude jaoks on parimaks ekspressioonisüsteemiks nendele valkudele evolutsiooniliselt kõige ligilähedasemad süsteemid. Prokarüootsete valkude jaoks sobivad seega hästi näiteks *Escherichia coli* bakterid, eukarüootsete membraanvalkude jaoks on loomulikumaks ekspressioonisüsteemiks eukarüootsed süsteemid. (Bill *et al.* 2011). Üheks oluliseks bakterite süsteemi puudujäägiks eukarüootsete valkude tootmisel võib pidada prokarüootide võimetust teostada post-translatoorseid modifikatsioone. Paljud post-translatoorseid modifikatsioonid tagavad aga valgu õige funktsioneerimise. Lisaks sellele võivad bakterite süsteemides puududa vajalikud lipiidid ning tugivalgud. (Masotte 2003)

Teiseks lihtsaks ekspressioonisüsteemiks võib pidada pärmi, mille rakkudes suudetakse teostada post-translatoorseid modifikatsioone. Varasemad uuringud on aga näidanud, et



imetaja membraanvalgu N-glükosüleerimine on pärmis rakkudes ebaefektiivne. (Masotte 2003)

Imetajarakkude ekspressioonisüsteem on kõige loomulikum keskkond eukarüootsete valkude tootmiseks. Erinevad rakuliinid, näiteks COS, CHO ja HEK 293 võivad valke kas stabiilselt või lühiajaliselt toota. Imetajarakkudes toimuvad kõik post-translatoolsed modifikatsioonid, sealhulgas N-glükosüleerimine, seega toodetakse enamjaolt õigesti funktsioneerivad valgud. Samas on imetajarakkude paljundamine aeglane ja kallis protsess, seega ei eelistata nende kasutamist valkude üleekspressioonil. (Masotte 2003)

Bakuloviirusega nakatatud putukarakud on üks levinumaid ekspressioonisüsteeme eukarüootsete membraanvalkude tootmiseks. Rekombinantse bakuloviiruse genereerimiseks tranfekteeritakse putukarakud bakmiidiga, mis sisaldab huvi all olevat valku kodeerivat geeni. (Contreras-Comez *et al.* 2014) Enimlevinud putukarakuliinid, mida membraanvalkude tootmisel kasutatakse on Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) ning Hi5 (*Trichoplusia ni*). Bakuloviirus-putukarakk süsteem on usaldusväärne ning ohutu, kuid putukarakkude kasvatamine on keerulisem ja kallim kui ülalpool väljatoodud bakterite või pärmide. (He *et al.* 2014)

Bakuloviiruseid saab kasutada ka geenide toimetamiseks imetajarakkudesse, viimast rakendust nimetatakse BacMam süsteemiks. Antud süsteem on saanud populaarseks membraanvalkude uurimise meetodiks. BacMam bakuloviiruseid on kerge toota ning nad paljunevad vaid oma loomuliku peremehe, putuka rakus. See aga tagab kõrgema bioohutuse võrreldes imetajaviirustel põhinevate vektorite süsteemidega. (Kost *et al.* 2010)

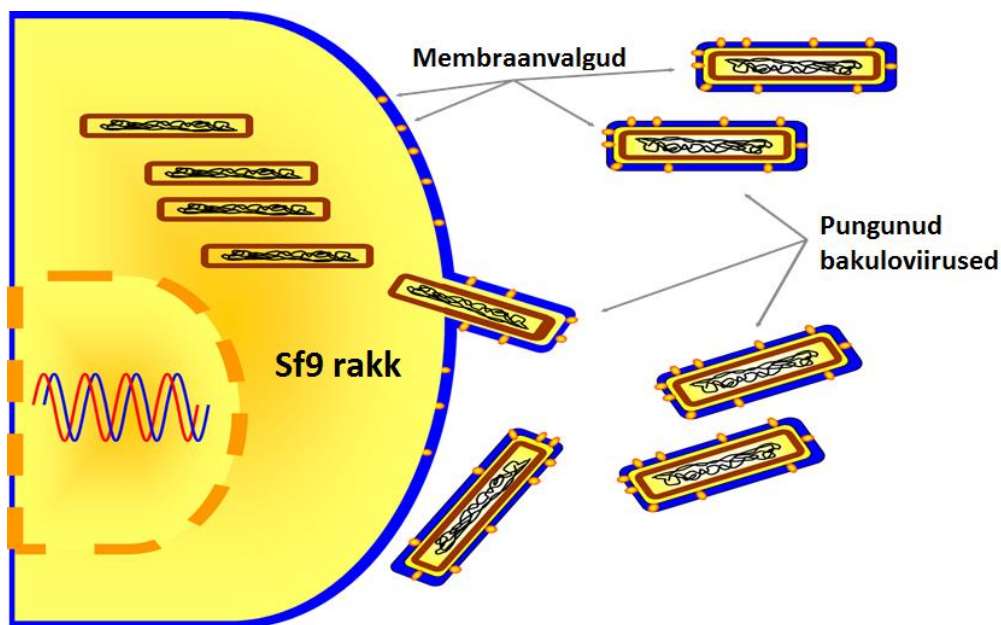
Meie laboris on kasutusele võetud pungunud bakuloviiruste pinna tehnoloogia, mis välistab membraanvalgu eraldamise etapi üleekspresseeritavate rakkude plasmamembraanist. (Veiksina *et al.* 2014)

### **1.5.1. Pungunud bakuloviiruste pinna tehnoloogia**

Pungunud bakuloviiruste pinna tehnoloogia (BVSD- *baculovirus surface display*) põhineb bakuloviiruste suutlikkusel ekspresseerida rakule mitte omaseid valke nii putukaraku pinnal kui ka bakuloviiruste endi ümbrisel. Putukaraku nakatustsükli ajal punguvad rakupinnalt

nukleokapsiidid, mille käigus tekivadki pungunud bakuloviirused (**Joonis 5**). (Mäkelä ja Oker-Blom 2008)

Bakuloviirused on kepikujulised viirused, mis on ümbritsetud lipiidse kaksikkihiga. Lipiidne kaksikkiht haaratakse peremeesraku pinnalt koos selles paiknevate membraanvalkudega kaasa. Bakuloviiruste diameeter on umbkaudu 40-50 nm ning pikkus 200-400 nm. Need omadused teevad bakuloviirustest põhimõtteliselt lahustuva ja rakuvaba süsteemi, mille abil membraanvalke nende loomulikus konformatsioonis ja keskkonnas uurida. (Mäkelä ja Oker-Blom 2008)



**Joonis 5.** Pungunud bakuloviiruste tootmine putukarakk-bakuloviirus süsteemis.

Bakuloviirused on inimestele ja keskkonnale ohutud ning nende suuremamahuline tootmine putukarakk-bakuloviirus süsteemis on odavapoolne. Nende omaduste tõttu on antud süsteem väga atraktiivne ning kasulik töövahend membraanvalkude ja ligandide interaktsioonide uurimiseks fluorestsentsanisotroopiaal põhinevate meetoditega. (Veiksina *et al.* 2014)

Käesolevas töös koekspresseeritakse putukarakk/bakuloviirus süsteemis 5-HT<sub>1A</sub> retseptorit koos G<sub>i</sub>-valgu  $\alpha$ -alaühikute ning  $\beta\gamma$ -dimeeriga, et fluorestsentsanisotroopiaal põhineva meetodiga uurida inhibeerivate G-valkude regulatsioonimehhanisme.

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Aparatuur ja töövahendid

Sf9-rakke kasvatati Erlenmeyeri kolbides ning rakutiheduse ja -elumuse hindamiseks kasutati mikroskoopi Olympus CKX31 ning rakulugejat TC10<sup>TM</sup> Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories). Bakuloviiruste tiitrimisel kasutati rakkude diameetri määramiseks Z2<sup>TM</sup> Series COULTER COUNTER® Cell and Particle Counterit (Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogiainstituudis, professor A. Kristjuhani loal). Bakuloviiruste kogumiseks kasutati SIGMA Laborzentrifugen 3K30 tsentrifuugi.

Fluorestsentsanisotroopial põhinevad katsed teostati kas plaadilugejaga Pherastar BMG Labtech või uue generatsiooni plaadilugejaga SYNERGY<sup>TM</sup> Neo (BioTek). Katsete teostamisel kasutati musta värvi, lamedapõhjalisi, poolt pindala hõivavaid 96-kohalisi mikroplaate, mis on kaetud mittesiduva pinnaga (Corning, Product No. 3993). Katsed teostati 27°C juures.

### 2.2. Materjalid

Inimese 5-HT<sub>1A</sub> retseptor, G<sub>i</sub>-valgu  $\alpha$ -alaühikud ning  $\beta\gamma$ -dimeerne alaühik ekspresseeriti *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) rakuliinis (Life Technologies). Rakud nakatati vastava retseptori ja G-valgu alaühikute DNA-fragmente sisaldavate rekombinantsete bakuloviirustega, mis konstrueeriti nagu on kirjeldatud (Tõntson *et al.* 2012). Sf9 rakke kasvatati seerumivabas söötmes ExCell<sup>TM</sup> 420 (Sigma-Aldrich) ning rakkude elumuse määramiseks kasutati trüpaansinist (Sigma-Aldrich).

MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, NaCl, etüleendiamiintetraatseethape (EDTA), dimetüül sulfoksiid (DMSO) ning HEPES osteti firmast AppliChem GmbH. Pluronic F-127 on pärit firmast Life Technologies ning saponiin Fisher Scientificust. Nukleotiidid GDP ja GTP $\gamma$ S osteti firmast Sigma-Aldrich. Fluorestsentsühend BODIPY-FL-NAN-190 telliti ettevõttest CellaAura ning BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S ja BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S firmast Life Technologies. 5-HT<sub>1A</sub> retseptori ligandid 8-hüdoksü-2-(di-n-propüülamino)tetraliin (8-OH-DPAT) ja N-(2-(4-(2-metoksüfenüül)-1-piperasiinüül)etüül)-N-(2-püridinüül)tsükloheksaan karboksamiin (WAY-100635) osteti firmast Tocris BioScience.

### 2.3. Sf9-rakkude kasvatamine

Sf9 putukarakke kasvatati suspensioonikultuurina Erlenmeyeri kolbides loksuti peal 27°C juures. Rakukasvatus toimus seerumivabas söötmes ExCell™ 420. Rakke jagati umbes iga 2 päeva tagant ning rakuarvu ja elumuse määramiseks kasutati 0,4% trüpaansinise lahust.

### 2.4. Rekombinantsete bakuloviiruste paljundamine

5-HT<sub>1A</sub> retseptorit ning G-valgu  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\alpha 3$ - ja  $\beta\gamma$ -alaühikuid kodeerivaid geene sisaldavate bakuloviiruste paljundamiseks transfekteriti eksponentsiaalses kasvufaasis olevaid Sf9 rakke nakatuskordsusega MOI=0,01 (ingl.k. *multiplicity of infection*). Nakatuskordsus väljendab viirusosakeste osakaalu rakkude suhtes (Shabram ja Aguilar-Cordova 2000). Rakkude tihedus nakatamise ajal oli  $1,5 \times 10^6$  rakku/ml ning elumus 99%. Nakatatud Sf9 rakke inkubeeriti 27°C juures kuni elumus oli langenud 30-40% peale (olenevalt valgust 72-96 tundi). Seejärel eemaldati rakud bakuloviirusosakesi sisaldavatest lahustest, tsentrifuugides lahuseid 10 minutit toatemperatuuril 3000 rpm-i juures. Viis erinevat rekombinantset bakuloviirust säilitati supernatandina pimedas 4°C juures.

Paljundatud bakuloviiruste nakatusvõimeliste osakeste kontsentratsiooni määramine teostati raku suuruse muutusel põhineva meetodiga nagu on kirjeldatud (Allikalt 2012). Meetod põhineb transfektsiooni poolt indutseeritud rakudiameetri muutuse määramisel. Lühidalt, algsest bakuloviiruse lahusest valmistati 12 seerialahjendust, iga lahjendusega transfekteriti eksponentsiaalses kasvufaasis olevaid Sf9 rakke tihedusega  $8 \times 10^5$  rakku/ml. 24 tunni möödudes määrati rakuloenduriga keskmine rakudiameeter ja –arv ning arvutati bakuloviiruse kontsentratsioon (ühikuga ivp/ml - nakatusvõimelist viirusosakest/ml) (Valem 2):

$$C_{viirus} = \frac{50\% \text{ maksimaalselt nakatunud rakkudest}}{EC_{50} \times V_{lahus}} \quad (2)$$

kus 50% maksimaalselt nakatunud rakkudest on süvendisse kantud rakkude arv,  $EC_{50}$  on pool maksimaalsest efektiivsest viirusosakeste kontsentratsioonist, mis on leitud rakudiameetri muutusest ning  $V_{lahus}$  on lahuse ruumala süvendis.

## 2.5. 5-HT<sub>1A</sub> retseptori ja G-valgu alaühikute koekspresseerimine Sf9-bakuloviirus süsteemis

5-HT<sub>1A</sub> retseptori,  $\beta\gamma$ -dimeeri ning kas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  või  $\alpha 3$  alaühiku koekspresseerimiseks Sf9-bakuloviiruse süsteemis nakatati 250 ml rakulahust kolme erineva viiruslahusega (5-HT<sub>1A</sub>,  $\beta\gamma$ ,  $\alpha i$ ) nii, et iga viiruse nakatuskordsus oli MOI = 2 ja seega kogu nakatuskordsus MOI=6. Rakkude tihedus oli nakatamise ajal  $2 \times 10^6$  rakku/ml ning elumus 99%. Rakke inkubeeriti 27°C juures kuni rakkude elumus oli langenud 20-30%-le (~72 tundi).

Pungunud bakuloviiruste kogumiseks tsentrifuugiti esmalt rakulahuseid 10 minutit 3000g juures. Seejärel eraldati viiruste lahused tuubi põhja tsentrifuugitud rakkudest. Rakusademest eraldatud viiruslahuste supernatante tsentrifuugiti uuesti 40 minutit 48 000g ja 4°C juures. Teise tsentrifuugimise järel eemaldati tuubide (V=25 ml) põhja sadenenud viiruste pealt lahus ning viirusosakesed resuspendeeriti Dulbecco fosfaatpuhverdatud soolalahuses (DPBS), mis sisaldas 2% dimetüül sulfoksiidi (DMSO). Ühe tuubi viirusosakeste kohta kasutati 1 ml DPBS-i, seega kontsentreeriti viirusosakesi esialgse ruumalaga võrreldes 25 korda. Saadud lahused säilitati alikvootidena pimedas -80°C juures.

## 2.6. Fluorestsentsanisotroopia määramine

Käesolevas töös teostati kõik katsed reaajas läbiviidava fluorestsentsanisotroopia määramismeetodiga kasutades plaadilugejaid Pherastar BMG Labtech ja SYNERGY<sup>TM</sup> Neo. Plaadilugeja Pherastar BMG Labtech puhul kasutati BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S-i ning BODIPY-FL-NAN-190 mõõtmiseks optilist moodulit ergastuslainepikkusega 485 nm (pilulaius 20 nm) ning emiteeritud kiirgus mõõdeti lainepikkusel 520 nm (pilulaius 20 nm). BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i mõõtmisel kasutati optilist moodulit ergastuslainepikkusega 560 nm (pilulaius 20 nm) ning emiteeritud kiirgus koguti lainepikkusel 630 nm (pilulaius 20 nm).

Plaadilugeja SYNERGY<sup>TM</sup> Neo puhul kasutati BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i mõõtmiseks optilist moodulit, mille ergastuslainepikkuseks oli 585 nm (pilulaius 20 nm) ning proovi poolt emiteeritud kiirgus mõõdeti lainepikkusel 635 nm (pilulaius 32).

Samaaegselt mõõdeti ergastuskiirguse tasandi suhtes nii paralleelselt kui ka risti orienteeritud fluorestsentsintensiivsust. Mõõdetud intensiivsused korrigeeriti bakuloviiruse lahusest pärineva taustafluorestsentsi baasil ning arvutati ümber fluorestsentsanisotroopiaks (valemiga 1).

Duaalse emissiooni detekteerimiseks kalibreeriti erinevate kanalite tundlikkus, mida iseloomustab G-tegur. Tundlikkus korrigeeriti fotokordistitorude võimenduste reguleerimise teel, kasutades standardina erütrosiin B-d (Thompson *et al.* 2002). G-teguri väärtuseks saadi kalibreerimise tulemusel 1, seega ei võetud seda anisotroopia arvutustes arvesse.

Kõik katsed teostati 27°C juures ning reaktsioonisegu ruumala plaadisüvendis oli 100 µl. Kõik katsed viidi läbi puhvis, pH=7,4 (20 mM Na-HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0,1% Pluronic F-127), kuhu lisati viirusosakeste membraanide permeabiliseerimiseks 50 µg/ml saponiini (Jacob *et al.* 1991), et nukleotiidid sisemembraanil paiknevatele G-valkudele ligi pääseksid.

#### **2.6.1. BODIPY-FL- ja BODIPY-TR-märgistatud GTPγS-i sidumisomaduste võrdlemine**

BODIPY-FL-GTPγS-i ja BODIPY-TR-GTPγS-i seostumise uurimiseks teostati fluorestsentsnukleotiidi küllastuskatsed Gαi-alaühikut sisaldavate viiruspreparaatidega. Küllastuskatse põhineb fluorestsentsnukleotiidide tiitrimisel erinevatel bakuloviirusosakeste kontsentratsioonidel. Fluorestsentsnukleotiidide spetsiifilise seostumise tase leiti märgistamata nukleotiidi puudumisel (totaalne seostumine) ja juuresolekul (mittespetsiifiline seostumine) saadud paralleelselt ja risti polariseeritud fluorestsentsintensiivsustest, mis arvutati ümber anisotroopia muuduks.

Fluorestsentsnukleotiidide kontsentratsioon süvendis oli nii BODIPY-FL- kui ka BODIPY-TR-GTPγS-i puhul 2 nM ja märgistamata GTPγS-i kontsentratsioon 10 µM. Fluorestsentsintensiivsused registreeriti 1 tund pärast lahuste plaadile kandmist ning kõiki katsepunkte mõõdeti duplikaatides.

### **2.6.2. Nukleotiidide seostumise uurimine Gai-valke sisaldavatele bakuloviirusosakestele**

Nukleotiidide ja G-valkude vaheliste interaktsioonide uurimiseks teostati BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i väljatõrjumiskatsed märgistamata nukleotiididega (GTP $\gamma$ S ja GDP). BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i kontsentratsioon oli 2 nM, konkureerivalt seostuvate nukleotiidide lahustest tehti 8 seerialahjendust (kontsentratsioonivahemikus  $10^{-11}$ - $10^{-4}$  M). Bakuloviiruse lahjendusfaktor alglahusest oli 0,1 (10% alglahusest), mis optimeeriti ülalpool kirjeldatud küllastuskatsetega. Kõiki katsepunkte mõõdeti duplikaatides. Fluorestsentsintensiivsused registreeriti 1 tund pärast märgistatud ja märgistamata nukleotiidide ning bakuloviiruse lahuste plaadile kandmist.

5-HT<sub>1A</sub> retseptori agonisti ja antagonist mõju uurimiseks nukleotiidide seostumisele lisati reaktsioonisegusse vastavalt 1  $\mu$ M 8-OH-DPAT (Montgomery *et al.* 1991) või 1  $\mu$ M WAY 100635 (Khawaja *et al.* 2006).

### **2.6.3. BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i seostumis- ja dissotsiatsioonikineetika uurimine**

Antud katsetes uuriti BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i assotsiatsiooni ja dissotsiatsiooni bakuloviirusosakestes ekspresseeritud G<sub>i</sub>-valkudele ning hinnati 2 mM Mg<sup>2+</sup>- ja Mn<sup>2+</sup>-ioonide mõju fluorestsentsnukleotiidi seostumisele. Assotsiatsioon algatati bakuloviiruse lahuse lisamisega fluorestsentsnukleotiidi lahusele. Pärast 1-tunnist assotsiatsioonikineetika mõõtmist alustati dissotsiatsioonikineetika mõõtmisega. Dissotsiatsioonikineetika uurimisel viidi läbi kolm erinevat dissotsiatsioonireaktsiooni, mis algatati kas GTP $\gamma$ S-i (10  $\mu$ M), GDP (10  $\mu$ M) või bivalentsete katioonide kelaatori EDTA (3 mM) lisamisega. BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i lõppkontsentratsioon süvendis oli 2 nM, bakuloviiruste lahjendusfaktor alglahusest oli 0,1. Katsepunktid mõõdeti triplikaatides.

### **2.6.4. Katsed BODIPY-FL-märgistatud NAN-190-ga**

BODIPY-FL-NAN-190 kasutati, et kontrollida 5-HT<sub>1A</sub> retseptorite olemasolu kõigis kolmes viiruspreparaadis, arvestades, et bakuloviiruste lahjendusfaktor katsepunktis on 0,1. Lisaks

sellele uuriti BODIPY-FL-NAN-190-ga GTP $\gamma$ S-i mõju agonisti seostumisele 5-HT<sub>1A</sub> retseptorile.

BODIPY-FL-NAN-190 kontsentratsioon oli iga katse puhul 1,35 nM, bakuloviiruse lahjendusfaktor alglahusest oli 0,1.

Et teha kindlaks, kas retseptor on viiruspreparaatides ekspresseerunud, kontrolliti spetsiifilist seostumist konkureeriva ligandi WAY 100635 (10  $\mu$ M) puudumisel (totaalne seostumine) ja juuresolekul (mittespetsiifiline seostumine) saadud fluorestsentsanisotroopia tasemetest. Kõiki katsepunkte mõõdeti triplikaatides.

GTP $\gamma$ S-i mõju uurimiseks agonisti 8-OH-DPAT seostumisele 5-HT<sub>1A</sub> retseptorile teostati BODIPY-FL-NAN 190 väljatõrjumiskatsed 8-OH-DPAT-ga 10  $\mu$ M GTP $\gamma$ S-i juuresolekul. Konkureerivalt seostuva agonisti lahusest tehti seerialahjendused (kontsentratsioonivahemikus 10<sup>-4</sup>-10<sup>-10</sup>M) ning fluorestsentsintensiivsused registreeriti 1 tund pärast märgistatud ja märgistamata ligandi ning bakuloviiruse lahuse plaadile kandmist. Mõõtmised teostati duplikaatides.

## 2.7. Andmeanalüüs

Andmetöötlus ning tulemuste graafiline esitamine teostati programmiga GraphPad Prism 5.0.

*Nukleotiidide ning agonisti väljatõrjumiskatsete analüüs:* Fluorestsentsanisotroopia väärtused esitati normaliseeritud kujul. Nukleotiidide ning agonisti sidumisafiinsused on esitatud vastavalt pIC<sub>50</sub> väärtustena, mis on negatiivne logaritm nukleotiidi või agonisti kontsentratsioonist, mille juures on inhibeeritud 50% maksimaalsest vastusest. IC<sub>50</sub> väärtused leiti sigmoidaalsete kontsentratsioon-vastus kõverate pealt, kasutades mittelineaarse regressiooni võrrandit:

$$A = \frac{A_{max} - A_{min}}{1 + 10^{\log C - \log IC_{50}}} + A_{min} \quad (3)$$

kus A on fluorestsentsanisotroopia, A<sub>max</sub> on G-valguga või retseptoriga seotud fluorestsentsligandi anisotroopia, A<sub>min</sub> on vaba fluorestsentsligandi anisotroopia, logC on logaritm väljatõrjuja kontsentratsioonist ning IC<sub>50</sub> on väljatõrjuja kontsentratsioon, mille juures on inhibeeritud 50% maksimaalsest vastusest.



*Fluorestsentsnukleotiidi seostumis- ja dissotsiatsioonikineetika analüüs:* Saadud assotsiatsioonikõveraid analüüsiti ühe-faasilise eksponentvõrrandi alusel, mille kaudu arvutati assotsiatsiooni kiiruskonstant  $k_{obs}$ :

$$A(t) = A_0 + (A_\infty - A_0) \times (1 - e^{-k_{obs} \cdot t}) \quad (4)$$

kus  $A(t)$  on fluorestsentsanisotroopia ajahetkel  $t$ ,  $A_0$  on anisotroopia väärtus ajahetkel  $t=0$ ,  $A_\infty$  on anisotroopia ajahetkel  $t \rightarrow \infty$  (plato – seotud fluorestsentsnukleotiidi anisotroopia) ning  $k_{obs}$  on assotsiatsiooni kiiruskonstant.

Dissotsiatsioonikõveraid analüüsiti ühe-faasilise eksponentvõrrandi alusel, mille kaudu arvutati dissotsiatsioonireaktsiooni kiiruskonstant  $k_{off}$ :

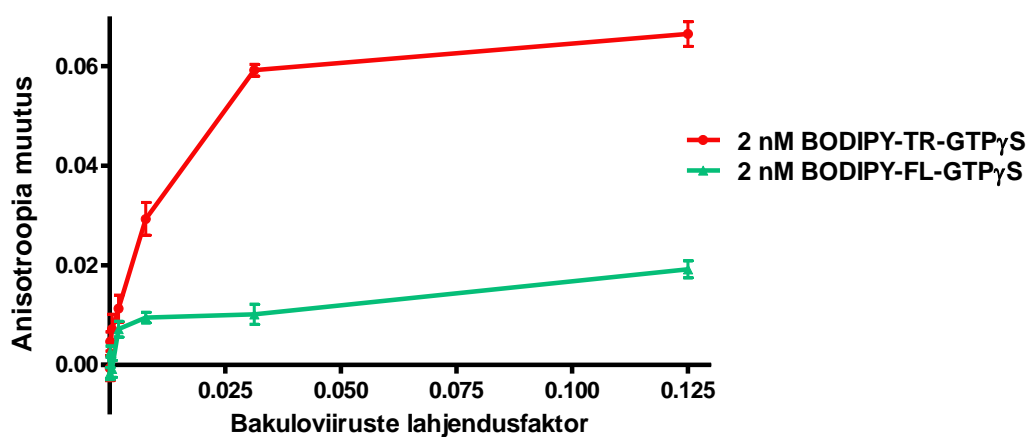
$$A(t) = (A_0 - A_\infty) \times e^{-k_{off} \cdot t} + A_\infty \quad (5)$$

kus  $A_\infty$  on anisotroopia ajahetkel  $t \rightarrow \infty$  (plato – vaba fluorestsentsnukleotiidi anisotroopia).

### 3. TULEMUSED JA ARUTELU

#### 3.1. BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S-i ning BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i sidumisomaduste võrdlemine bakuloviirusosakestele

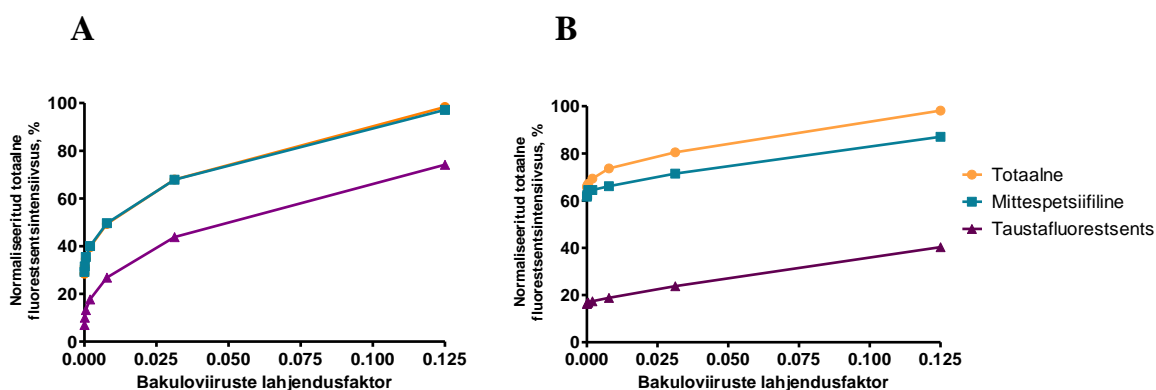
Varasemalt on meie töörühmas G $_i$ -valke uuritud puhastatud valgupreparaatide peal rohelise fluorestsentsnukleotiidi BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S-ga (Tõntson *et al.* 2012). Käesoleva töö eesmärgiks oli aga G $_i$ -valkude uurimiseks rakendada pungunud bakuloviiruste süsteemi, mis võimaldab lisaks kõrgele ekspressioonile luua funktsionaalseid multikomponentseid komplekse, lisaks sellele võimaldab bakuloviiruste süsteem ära jätta aeganõudva valgupuhastamise etapi. Töörühma varasemad uuringud on aga näidanud, et bakuloviirusosakeste autofluorestsents on rohelise valguse alas kõrge (andmed ei ole esitatud), seega ei pruugi roheline BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S antud rakenduses kõige efektiivsem fluorestsentsnukleotiid olla. Töö esimeseks eesmärgiks oli võrrelda rohelise BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S-i ja punase BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i sidumisomadusi bakuloviirusosakestes, kus ekspresseeriti lisaks 5-HT $_{1A}$  retseptorile ja  $\beta\gamma$ -dimeerile G-valgu  $\alpha 1$ -alaühikut.



**Joonis 6. BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S-i ning BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i spetsiifilise seostumise tase erinevatel bakuloviirusosakeste lahjendusfaktorite (alglahusest) juures.** Mõõtmised teostati duplikaatides kahe korduskatsena ning anisotroopia muutused registreeriti 1 tund pärast bakuloviiruste lahjenduste lisamist reaktsioonisegusse.

Jooniselt 6 on näha, et BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i rakendamine fluorestsentsanisotroopia määramisel bakuloviiruste süsteemis annab võrreldes BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S-ga ligikaudu

3-kordse signaaliakna suurenemise. Joonisel 7A ning 7B on toodud vastavalt BODIPY-FL- ja BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i totaalsele ja mittespetsiifilisele seostumisele vastavad fluorestsentsintensiivsused võrreldes viirusosakeste taustafluorestsentsiga. Näha on, et punase valguse alas ( $\lambda_{\text{ergastus}}=560$  nm) moodustab bakuloviirusosakeste taustafluorestsents totaalse seostumise intensiivsusest ligikaudu 30%, BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S-ga mõõtes ( $\lambda_{\text{ergastus}}=485$  nm) aga kuni 75%. Oluliseks tulemuseks on ka see, et BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S-i puhul on praktiliselt võimatu eristada totaalse ja mittespetsiifilise seostumise fluorestsentsintensiivsusi (Joonis 7.A).



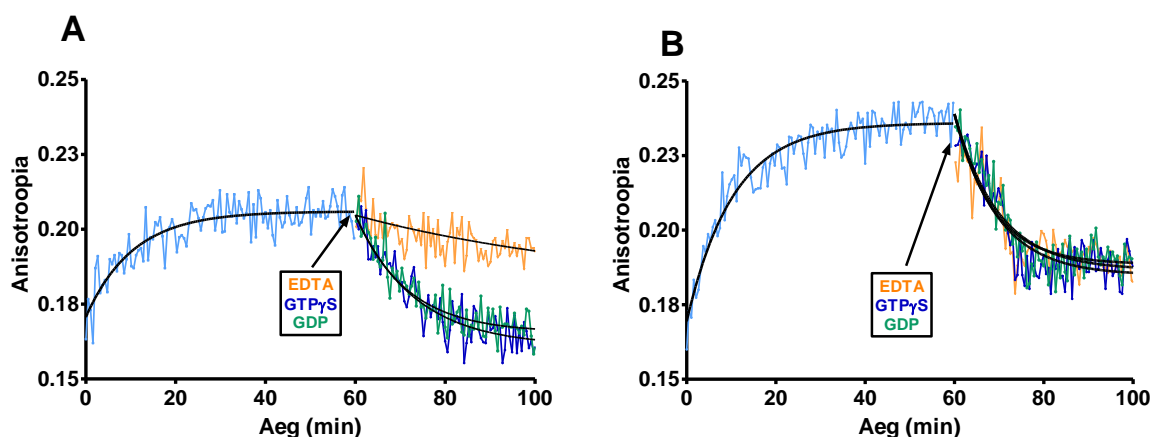
**Joonis 7. BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S-i (A) ning BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i (B) totaalsele (oranž) ja mittespetsiifilisele (sinine) seostumisele vastav fluorestsentsintensiivsuste tase bakuloviirusosakeste taustafluorestsentsi (violetne) suhtes erinevate BV lahjendusfaktorite juures.** Bodipy-FL-GTP $\gamma$ S-i mõõtmisel kasutati ergastus ja emissiooni lainepikkusi:  $\lambda_{\text{ergastus}} = 485$  nm,  $\lambda_{\text{emissioon}} = 520$  nm, BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S- puhul:  $\lambda_{\text{ergastus}} = 560$  nm,  $\lambda_{\text{emissioon}} = 630$  nm. Mõõtmised teostati duplikaatides kahe korduskatsena ja fluorestsentsintensiivsused registreeriti 1 tund pärast bakuloviiruste lahjenduste lisamist reaktsioonisegusse. Intensiivsused on normaliseeritud kõrgeima fluorestsentsintensiivsuse väärtuse järgi.

Antud katsetega näidati, et rohelise valguse alas mõõtes on bakuloviirusosakeste taustafluorestsents fluorestsentsnukleotiidi totaalsele ja mittespetsiifilisele seostumisele vastava intensiivsusega võrreldes kõrge ning seega ei ole BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S bakuloviiruste uurimiseks efektiivne. BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S annab aga mitu korda suurema muutuse fluorestsentsanisotroopia signaalis ning on bakuloviiruste süsteemi puhul hästi rakendatav. Seetõttu kasutati käesolevas töös edaspidi vaid BODIPY-TR-märgistatud GTP $\gamma$ S-i.

Antud küllastuskatsetega valiti iga viiruspreparaadi jaoks optimaalne lahjendusfaktor, kus fluorestsentsnukleotiidi spetsiifilisele seostumisele vastav sanisotroopia küllastunud oli. Iga preparaadi puhul valiti lahjendusfaktoriks 0,1.

### 3.2. BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i seostumis- ja dissotsiatsioonikineetika määramine Mg $^{2+}$ - või Mn $^{2+}$ -ioonide juuresolekul

Varasemad uuringud (Malarkey *et al.* 2008, Parkel *et al.* 2011, Tõntson *et al.* 2012) on näidanud, et magneesiumioonid on nukleotiidide seostumisel G-valgu  $\alpha$ -alaühikule hädavajalikud, magneesiumioonid katalüüsivad GDP dissotsiatsiooni ja GTP seostumist  $\alpha$ -alaühikule. Samuti on varasemalt näidatud, et magneesium ja mangaan võivad organismis seostuda samadesse retseptor-G-valk kompleksi sidumistaskutesse (Freisinger ja Sigel 2007). Käesoleva töö üheks eesmärgiks oli uurida BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i seostumiskineetikat bakuloviirustes ekspresseeritud G-valgu  $\alpha$ 1-alaühikule nii magneesiumi- (2mM) kui ka mangaaniioonide (2 mM) juuresolekul. Fluorestsentsnukleotiidi dissotsiatsiooni iseloomustamiseks algatati dissotsiatsioonireaktsioon kas EDTA või märgistamata nukleotiidi (GTP $\gamma$ S ja GDP) lisamisega.



**Joonis 8. BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i (2 nM) assotsiatsioon ja dissotsiatsioon 2 mM Mg $^{2+}$  (A) või 2mM Mn $^{2+}$  (B) juuresolekul.** Mõõtmised teostati duplikaatides kahe korduskatsena. Assotsiatsiooni mõõtmine peatati 60. minutil ning dissotsiatsioonireaktsioonid algatati 3 mM EDTA (oranž), 10  $\mu$ M GTP $\gamma$ S-i (sinine) või 10  $\mu$ M GDP (roheline) lisamisega katsepunktidesse.

Joonisel 8 on välja toodud BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i assotsiatsiooni- ja dissotsiatsioonikõverad ning tabelis 1 on näha assotsiatsiooni ja dissotsiatsioonireaktsioonide kiiruskonstandid (vastavalt  $k_{\text{obs}}$  ja  $k_{\text{off}}$ ) nii Mg $^{2+}$ - kui ka Mn $^{2+}$ -ioonide juuresolekul. Tulemustest on näha, et BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S on pigem aeglase assotsiatsiooni ja dissotsiatsioonikineetikaga fluorestsentsnukleotiid. Mn $^{2+}$  juuresolekul on fluorestsentsnukleotiidi sidumine

bakuloviirusosakestele sama kiire kui  $Mg^{2+}$  puhul. Ka fluorestsentsnukleotiidi dissotsiatsiooni poolestusajad märgistamata nukleotiididega väljatõrjumisel on praktiliselt samad mõlema metalliooni juuresolekul. Tulemustest järeldub, et mangaan suudab nukleotiidide sidumise reguleerimisel magneesiumit asendada. Jooniselt 8 ja tabelist 1 on näha, et võrreldes märgistamata nukleotiididega on dissotsiatsioon EDTA-ga magneesiumi juuresolekul märkimisväärselt aeglasem. EDTA on bivalentsete metallikatioonide kelaator, mis seob enda külge  $Mg^{2+}$ - ja  $Mn^{2+}$ -ioonid, nende metalliooni eemaldamisel väheneb nukleotiidi sidumine G-valgu  $\alpha$ -alaühikule. Tulemustest võib eeldada, et EDTA-l puudub otsene ligipääs  $Mg^{2+}$ -ioonidele. On võimalik, et BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S peab kõigepealt  $\alpha$ -alaühiku küljest dissotsieeruma, võimaldamaks EDTA-le ligipääsu magneesiumioonidele, see on aga aeglane protsess.

**Tabel 1. BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i assotsiatsiooni- ja dissotsiatsioonireaktsiooni kiiruskonstandid (vastavalt  $k_{obs}$  ja  $k_{off}$ ) ja poolestusajad koos standardvigadega (SEM).**

	$Mg^{2+}$			$Mn^{2+}$		
$k_{obs} (\frac{1}{min})$	$0,093 \pm 0,002$			$0,095 \pm 0,002$		
Reaktsiooni poolestusaeg (min)	$7,63 \pm 0,20$			$7,33 \pm 0,12$		
	EDTA	GTP $\gamma$ S	GDP	EDTA	GTP $\gamma$ S	GDP
$k_{off} (\frac{1}{min})$	$0,010 \pm 0,001$	$0,093 \pm 0,014$	$0,101 \pm 0,006$	$0,092 \pm 0,010$	$0,110 \pm 0,013$	$0,115 \pm 0,015$
Reaktsiooni poolestusaeg (min)	$69,95 \pm 7,44$	$7,66 \pm 1,16$	$6,89 \pm 0,38$	$7,58 \pm 0,97$	$6,30 \pm 0,38$	$6,04 \pm 0,30$

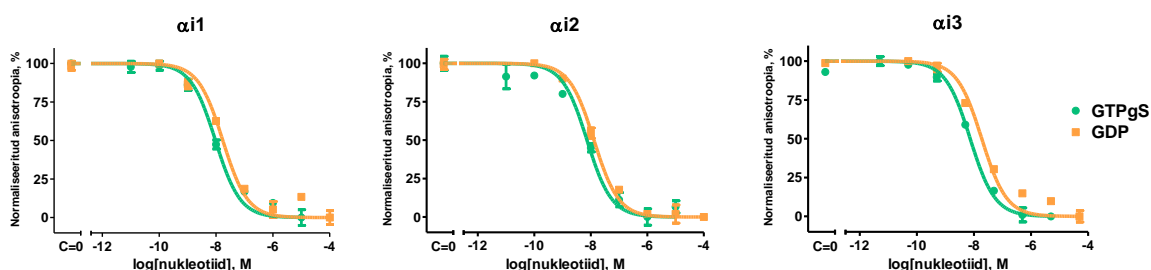
Siinkohal on huvitav ka asjaolu, et mangaani juuresolekul kulgeb BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i dissotsiatsioon EDTA-ga lõpuni (signaal langeb peaaegu vaba ligandi anisotroopia tasemeni). On võimalik, et  $Mn^{2+}$ -ioonidel on G-valgu suhtes madalam afiinsus kui  $Mg^{2+}$ -ioonidel, mistõttu saab EDTA mangaaniioonid G-valgu kompleksist hõlpsamini eemaldada kui magneesiumioonid.

Jooniselt 8 on näha, et magneesiumioonide juuresolekul on vaba ning seostunud BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i fluorestsentsanisotroopia muutus ligikaudu 2 korda väiksem kui mangaaniioonide juuresolekul. Assotsiatsiooni ning dissotsiatsiooni (märgistamata nukleotiidide puhul) kiiruskonstandid on aga kahe metalliooni puhul ligilähedased. Siit võiks järeldada, et kompleksis mangaaniioonide ning G-valguga võib BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i

lokaalne pöörlemisvabadus sidumistaskus olla väiksem kui magneesiumioonide puhul. See aga suurendabki fluorestsentsanisotroopia muutust vaba ja seotud ligandi vahel.

### 3.3. Nukleotiidide sidumisafiinsuste määramine bakuloviirusosakestes ekspresseeritud G $\alpha$ i-valkudele

Töö järgmiseks etapiks oli nukleotiidide GTP $\gamma$ S ja GDP sidumisafiinsuste määramine bakuloviirusosakestes, kus oli lisaks 5-HT<sub>1A</sub> retseptorile ja  $\beta\gamma$ -dimeerile ekspresseeritud kolm erinevat  $\alpha$ i-alaühikut:  $\alpha$ i1,  $\alpha$ i2 ja  $\alpha$ i3.



**Joonis 9. BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i kontsentratsioon-vastus väljatõrjumiskõverad märgistamata nukleotiididega kolme erineva  $\alpha$ i- alaühiku puhul.** Mõõtmised teostati duplikaatides vähemalt kahe korduskatsena. Fluorestsentsintensiivsused registreeriti 1 tund pärast lahuste lisamist plaadile.

Tabelis 2 on toodud nukleotiidide sidumisafiinsused erinevat  $\alpha$ i-alaühikut ekspresseerinud bakuloviirusosakestele. Tulemustest on näha, et  $\alpha$ i2- ja  $\alpha$ i3-alaühiku puhul on GDP-l madalam sidumisafiinsus kui GTP $\gamma$ S-l.  $\alpha$ i1 puhul kahe nukleotiidi afiinsused ei eristunud. Samuti ei eristunud märkimisväärselt nukleotiidide afiinsused erinevate  $\alpha$ -alaühikute suhtes, mis ühtis tööühmas varem saadud tulemustega (Tõntson *et al.* 2013).

**Tabel 2. Nukleotiidide pIC<sub>50</sub>  $\pm$  SEM väärtused kolme erineva  $\alpha$ i-alaühiku suhtes, mis on arvutatud vähemalt kahe korduskatse tulemustest.**

	$\alpha$ i1	$\alpha$ i2	$\alpha$ i3
GTP $\gamma$ S	8,16 $\pm$ 0,08	8,07 $\pm$ 0,07	8,12 $\pm$ 0,03
GDP	8,03 $\pm$ 0,17	7,80 $\pm$ 0,06	7,72 $\pm$ 0,06

### 3.3.1. 5-HT<sub>1A</sub> retseptori agonisti ja antagonistide efekt nukleotiidide seostumisele

Käesolevas töös koekspresseeriti putukarakk-bakuloviirus süsteemis koos G-valgu alaühikutega ka 5-HT<sub>1A</sub> retseptor. Et uurida, kuidas retseptori aktiveerimine või blokeerimine G-valgu regulatsioonile mõjub, uuriti retseptori agonisti (8-OH-DPAT) ja antagonistide (WAY 100635) mõju nukleotiidide seostumisele G-valgu  $\alpha$ -alaühikule.

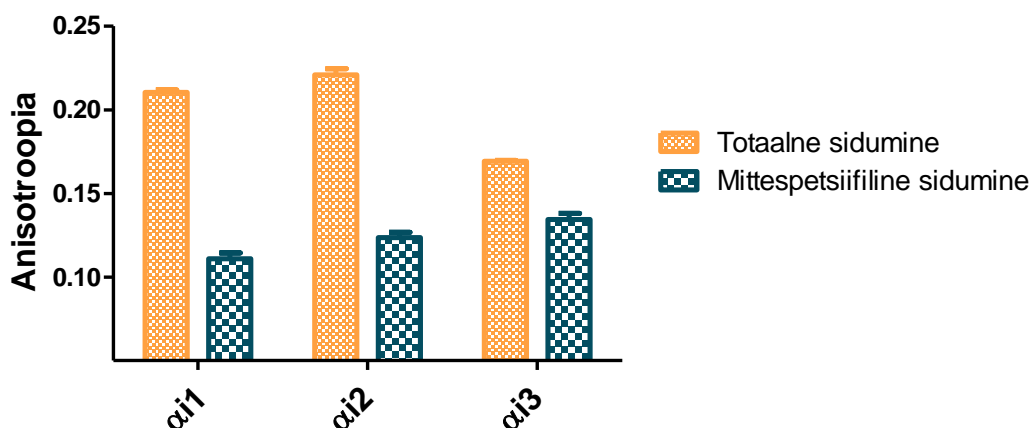
Retseptor-G-valgu kompleksi regulatsiooni uurimiseks teostati peatükis 3.3 kirjeldatud väljatõrjumiskatsed analoogsed katsed 5-HT<sub>1A</sub> retseptori agonisti ja antagonistide juuresolekul. 8-OH-DPAT-i ja WAY 100635 lõppkontsentratsioon katsepunktis oli 1  $\mu$ M.

Esialgsed tulemused näitasid, et retseptori aktiveerimine (agonisti juuresolekul) ei muuda nukleotiidide sidumisaafiinsusi võrreldes blokeeritud retseptoriga (antagonisti juuresolekul). Nukleotiidide pIC<sub>50</sub> väärtused jäid agonisti ja antagonistide juuresolekul samasse suurusjärku kui agonisti ja antagonistide puudumisel. Sellest tulenevalt teostati järgmiseks katsed, kus kontrolliti, kas 5-HT<sub>1A</sub> retseptor on antud viiruspreparaatides ekspresseeritud.

### 3.4. 5-HT<sub>1A</sub> retseptori ekspressiooni kontrollimine BODIPY-FL-NAN-190-ga

5-HT<sub>1A</sub> retseptori ekspressiooni kontrollimiseks võeti kasutusse BODIPY-FL-ga märgistatud NAN-190, mis on 5-HT<sub>1A</sub> retseptori osaline agonist. Täpsemalt kontrolliti BODIPY-FL-NAN-190 (1,35 nM) spetsiifilist seostumist konkureeriva ligandi WAY 100635 (10  $\mu$ M) puudumisel (totaalne seostumine) ja juuresolekul (mittespetsiifiline seostumine) saadud fluorestsentsintensiivsustest.

Jooniselt 10 on näha, et  $\alpha$ 1- ja  $\alpha$ 2-alaühikut sisaldava viiruspreparaadi puhul eristub totaalsele seostumisele vastav fluorestsentsanisotroopia signaal märkimisväärselt mittespetsiifilisele seostumisele vastavast signaalist.  $\alpha$ 3-alaühiku puhul oli spetsiifilisele seostumisele vastav anisotroopia muutus aga mitu korda väiksem. Siit saab järeldada, et kahes viiruspreparaadis oli 5-HT<sub>1A</sub> retseptor ekspresseerunud,  $\alpha$ 3-alaühikut sisaldava preparaadi retseptori ekspressioon oli aga madal.



**Joonis 10. BODIPY-FL-NAN-190 totaalsele (oranž) ja mittespetsiifilisele (sinine) seostumisele vastav fluorestsentsanisotroopia tase kolme erineva viiruspreparaadi puhul.** Mõõtmised teostati triplikaatides ning anisotroopia muutused registreeriti 30 minutit pärast lahuste kandmist plaadile.

Eelmiste katsete põhjal selgus aga, et agonisti ja antagonistide efekt nukleotiidide sidumisele ei eristu, seega võib eeldada, et bakuloviiruste süsteemis koekspressseeritud retseptor ja G-valk ei ole omavahel seotud. Lisaks sellele ei saa eeldada, et erinevaid valke kodeerivaid geene sisaldavad bakuloviirused nakatasid samasid rakke. Võimalik, et 5-HT<sub>1A</sub> retseptorit kodeerivat geeni sisaldav bakuloviirus nakatas erinevaid rakke kui G-valgu alaühikuid kodeerivaid geene sisaldavad viirused. Sellisel juhul võib preparaat koosneda viirusosakestest, millest teatud osa sisaldas retseptorvalku ja teatud osa G-valke. See seletaks retseptori ja G-valgu vahelise interaktsiooni puudumist antud süsteemis.

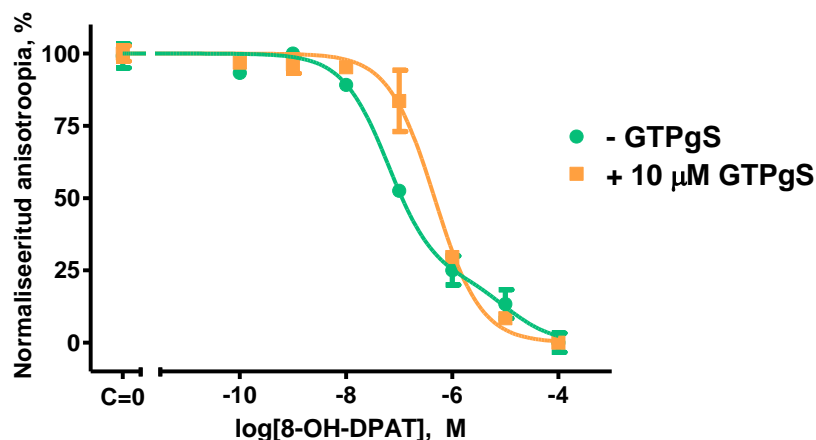
Antud valkude koekspressseerimisel bakuloviiruste süsteemis valiti iga G-valgu alaühiku ning retseptori nakatuskordsuseks MOI=2, seega oli summaarne nakatuskordsus MOI=6 nagu on kirjeldatud peatükis 2.5. Võimalik aga, et antud nakatuskordsused ei sobi nende valkude koekspressseerimiseks, seega peaks tulevikus optimeerima erinevaid nakatustingimusi.

### 3.5. GTP $\gamma$ S-i mõju 5-HT<sub>1A</sub> retseptori agonisti seostumisele

Et kontrollida, kas ka G-valgu poolse regulatsiooniga retseptor-G-valk kompleksi vahelist interaktsiooni näha ei ole, teostati katse, kus uuriti GTP $\gamma$ S-i mõju 5-HT<sub>1A</sub> retseptori agonisti seostumisele retseptorile. Selleks teostati 1,35 nM BODIPY-FL-NAN-190 väljatõrjumine 8-OH-DPAT-ga 10  $\mu$ M GTP $\gamma$ S-i juuresolekul. Katse teostati  $\alpha i2$ -alaühikut ekspresseerinud



bakuloviirusosakestega, lähtudes sellest, et eelmises katses saadud fluorestsentsligandi spetsiifilise seostumise tase oli selle viiruspreparaadi puhul kõrge.



**Joonis 11. BODIPY-FL-NAN-190 kontsentratsioon-vastus väljatõrjumiskõverad 8-OH-DPAT-ga GTPγS-i puudumisel (roheline) ja juuresolekul (oranž).** Mõõtmised teostati duplikaatides ning fluorestsentsintensiivsused registreeriti 1 tund pärast lahuste lisamist plaadile.  $pIC_{50}^K$  (8-OH-DPAT) = 7,20 ja  $pIC_{50}^M$  (8-OH-DPAT) = 4,96 ;  $pIC_{50}$  (8-OH-DPAT+10 μM GTPγS) = 6,33.

Esimene katse GTPγS-i efekti uurimiseks agonisti seostumisele 5-HT<sub>1A</sub> retseptorile näitas, et GTPγS-i juuresolekul alaneb 8-OH-DPAT-i sidumisafiinsus ligikaudu pool suurusjärku. Ka varasemad uuringud on näidanud, et GTPγS-i juuresolekul väheneb agonisti seostumine 5-HT<sub>1A</sub> retseptorile (Newman-Tancredi *et al.* 2001). Selle põhjuseks võib olla nukleotiidivaba G-valgu koguse vähenemine GTPγS-i lisamisel, nukleotiidivaba G-valk on aga vajalik 5-HT<sub>1A</sub> retseptori ja G-valgu omavaheliseks seostumiseks ning agonisti kõrge afiinsusega seostumiseks retseptorile. Varasemate uuringute kohaselt on 8-OH-DPAT-i seostumine 5-HT<sub>1A</sub> retseptorile kaheastmeline (Newman-Tancredi *et al.* 2001, Tõntson *et al.* 2014), mida täheldati ka antud katses (kõrge ning madala afiinsusega seostumise  $pIC_{50}$  väärtused on tähistatud vastavalt  $pIC_{50}^K$  ning  $pIC_{50}^M$ ).

Kuna antud tulemustest on GTPγS-i lisamisel näha vaid väikest muutust agonisti sidumisafiinsuses, siis võib järeldada, et 5-HT<sub>1A</sub>-G<sub>i</sub>-valk kompleksi ekspresseerimisel bakuloviiruste süsteemis toimub retseptori ja G-valgu vaheline seostumine väga vähesel määral. Seega on vaja antud süsteemi ning erinevaid nakatustingimusi edaspidi optimeerida.

## KOKKUVÕTE

G-valgud on molekulaarlülitid, mis käivitavad G-valk seotud retseptorite rakuvälise aktiveerimise tagajärjel rakusisesed signaalirajad. Kuna läbi GPCR-de saab reguleerida paljusid rakulisi funktsioone, on need valgud sihtmärgiks väga paljudele turulolevatele retseptiravimitele. Kuigi G-valgu aktivatsioon ja regulatsioon on signaaliülekanne võtmeetapp, on siiani uuringud keskendunud pigem GPCR-dele või sekundaarsetele virgatsainetele. Antud töös uuriti  $G_i$ -valkudega seotud regulatsioone, rakendades uutset bakuloviiruste pinna tehnoloogiat, mille abil koekspressseeriti serotoniini 1A retseptor koos G-valgu  $\alpha$ - ning  $\beta\gamma$ -alaühikuga.

Töö esimeseks eesmärgiks oli võrrelda kahe fluorestsentsnukleotiidi, BODIPY-FL- ja BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i sidumisomadusi bakuloviiruspreparaatides. Selgus, et bakuloviirusosakeste autofluorestsents rohelise valguse alas on väga kõrge, seega on rohelise BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S-ga antud preparaate keeruline uurida. Seetõttu kasutati edaspidi vaid punase spektriala fluorestsentsnukleotiidi, BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i, mis andis mitu korda suuremaid fluorestsentsi signaaliaknaid kui tema analoog.

Varasemalt on näidatud, et magneesiumioonide juuresolek nukleotiidide seostumisel G-valgule on hädavajalik ning mangaan suudab magneesiumioone antud funktsiooni täitmisel asendada. Antud töös määrati BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i seostumis ja dissotsiatsioonikineetikat mõlema katiooni juuresolekul, mille käigus selgus, et assotsiatsiooni ja dissotsiatsiooni poolestusajad langesid omavahel kahe metalliooni puhul kokku. Samuti näidati, et BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S on pigem aeglase assotsiatsiooni ja dissotsiatsiooniga nukleotiid. Lisaks fluorestsentsnukleotiidi uurimisele, määrati ka märgistamata nukleotiidide sidumisafiinsused  $G_i$ -valgule.

Lisaks eelnevale uuriti 5-HT<sub>1A</sub> retseptori ja G-valgu vahelisi interaktsioone. Esimeste katsete põhjal on võimalik järeldada, et toodetud preparaatides puudub retseptor-G-valgu vaheline seostumine signaaliraja aktiveerimisel. Seega tuleks tulevikus bakuloviiruste süsteemi erinevate viiruste koekspressseerimise puhul optimeerida.

## TÄNUAVALDUSED

Suurimad tänusõnad kuuluvad minu juhendajatele Ago Rinkenile ning Sergei Kopanchukile. Tänu Ago Rinkenile olen õppinud iseseisvalt orienteeruma nii teadusmaastikul kui ka laboris. Tänu Sergei Kopanchukile olen aga õppinud oma tööd tegema korrektselt, mis on teadustöö kirjutamisel väga oluline.

Täna kogun oma uurimisrühma positiivse ja pingevaba keskkonna loomise eest. Eriti tänan Anni Allikalt ja Olga Mazinat, kellel on alati kasulikud nõuanded varuks ning kes on minu jaoks olnud väga suureks motivatsiooniallikaks.

Siinkohal tänan ka Lauri Tõntsonit, kes viis mind kurssi Sf9-rakkude hingeeluga ning juhatas mulle teed G-valkude uurimisel.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Allikalt A. Bakalaureusetöö. Bakuloviiruste tiitrimismeetodite võrdlus. 2012.
- Bill R. M.; Henderson P. J. F.; Iwata S.; Kunji E. R. S.; Michel H.; Neutze R.; Newstead S.; Poolman B.; Tate C. G.; Vogel H. Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nature Biotechnology*. 29(4): 225-40. 2011.
- Brady S. T.; Siegel G. J.; Albers R. W.; Price D. L. *Basic neurochemistry* 8th Ed. Elsevier Academic Press. 2012.
- Chen L.; Jin L.; Zhou N. An update of novel screening methods for GPCR in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 7: 791-806. 2012.
- Contreras-Comez A.; Sanchez-Miron A.; Garcia-Camacho F.; Molina-Grima E.; Chisti Y. Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnology Progress*. 30(1): 1-18. 2014.
- Dhanasekaran N.; Tsim S. T.; Dermott J. M.; Onesime D. Regulation of cell proliferation by G proteins. *Oncogene*. 1998, 17, 1383-1394.
- el Mestikawy S.; Fargin A.; Raymond J.R.; Gozlan H.; Hnatowich M. The 5-HT<sub>1A</sub> receptor: an overview of recent advances. *Neurochem Res*. 16(1): 1-10. 1991.
- Freisinger E.; Sigel R.K.O. From nucleotides to ribozymes- a comparison of their metal ion binding properties. *Coord. Chem. Rev.* 251:1834-51. 2007.
- Goitre L.; Trapani E.; Trabalzini L.; Retta S. F. The Ras Superfamily of Small GTPases: The Unlocked Secrets. *Methods in Molecular Biology*. 1120: 1-18. 2014.
- Goncalves M.S.T. Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes. *Chem.Rev.* 109: 190-212. 2009.
- He Y.; Wang K.; Yan N. The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins. *Protein Cell*, 5(9): 658-672. 2014.
- Hoyer D.; Hannon J.P.; Martin G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 71(4): 533-554. 2002.
- Hill S. J.; Williams C.; May L. T. Insights into GPCR pharmacology from the measurements of the intracellular cyclic AMP. *British Journal of Pharmacology*. 2010, 161, 6, 1266-1275

- Jacob M.C.; Favre M.; Bensa J.C. Membrane cell permeabilization with saponin and multiparametric analysis by flow-cytometry. *Cytometry*. 12 (6): 550-558. 1991.
- Jin L.; Li Y. Structural and functional insights into nuclear receptor signaling. *Adv Drug Deliv Rev*. 62(13): 1218-1226. 2010.
- Khawaja X.Z.; Smith D.L.; Nawoschik S.P.; Zhang J.; Dunlop J.; Dilks D.W.; Olsen M.; Schechter L.E. WAY-100635 antagonist-induced plasticity of 5-HT receptors: regulatory differences between a stable cell line and an in vivo native system. *J Neurochem*. 98(1): 134-45. 2006.
- Kost A.; Condreay T. P.; Ames J. S. Baculovirus Gene Delivery: A Flexible Assay Development Tool. *Current Gene Therapy*. 2010, 10, 3, 168-173.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. Biosignaling, In: *Principles of Biochemistry*. W.H.Freeman and Company., New York. 2005.
- Loudet A.; Burgess K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem. Rev*. 107, 4891-4932. 2007.
- Malarkey C.S.; Wang G.; Ballicora M.A. Mota de Freitas D.E. Evidence for two distinct Mg<sup>2+</sup> binding sites in G(s alpha) and G(i alpha1) proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 372(4): 866-9. 2008.
- Masotte D. G protein-coupled receptor overexpression with the baculovirus-insect cell system: a tool for structural and functional studies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1610: 77-89. 2003.
- Montgomery A.M.J.; Rose C.I.; Herberg L.J. 5-HT<sub>1A</sub> agonists and dopamine: the effects of 8-OH-DPAT and buspirone on brain-stimulation reward. *Journal of Neural Transmission*. 83 (1-2): 139-148. 1991.
- Mäkelä A.R.; Oker-Blom C. The baculovirus display technology-an evolving instrument for molecular screening and drug delivery. *Comb Chem High Throughput Screen*. 11(2): 86-98. 2008.
- Newman-Tancredi A.; Verrièle L.; Millan M.J. Differential modulation by GTPγS of agonist and inverse agonist binding to h5-HT<sub>1A</sub> receptors revealed by [3H]-WAY 100635. *Br J Pharmacol*. 132(2): 518-524. 2001.
- Oldham W. M.; Hamm H. E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1: 60-71. 2008.

- Parkel S.; Tõntson L.; Rinken A. Millimolar  $Mn^{2+}$  influences agonist binding to 5-HT<sub>1A</sub> receptors by inhibiting guanosine nucleotide binding to receptor-coupled G-proteins. *Neurotoxicology*. 32: 25-30. 2011.
- Pytliak M.; Vargova V.; Mechirova V.; Felšöci M. Serotonin Receptors- From Molecular Biology to Clinical Applications. *Physiol. Res.* 60: 15-25. 2011.
- Quintanar L. Manganese neurotoxicity: A biororganic chemist's perspective. *Inorganica Chimica Acta*. 361: 875-884. 2008.
- Roberts D.J.; Waelbroeck M. G protein activation by G protein coupled receptors: ternary complex formation or catalyzed reaction. *Biochemical Pharmacology*. 68: 799-806. 2004.
- Rosenbaum D. M.; Rasmussen S. G. F.; Kobilka B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245): 356-363. 2009.
- Shabram P.; Aguilar-Cordova E. Multiplicity of Infection/Multiplicity of Confusion. *Molecular Therapy*. 2, 420-421. 2000.
- Sridharan R.; Zuber J.; Connelly S. M.; Mathew E.; Dumont M. E. Fluorescent Approaches for understanding interactions of Ligands with G protein coupled receptors. *BioChim Biophys Acta*, 1838(100): 15-33. 2014.
- The Molecular Probes® Handbook | Life Technologies  
<https://www.lifetechnologies.com/ee/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/fluorophores-and-their-amine-reactive-derivatives/bodipy-dye-series.html>  
Viimati allalaetud: 19.05.2015
- Thompson R.B.; Gryczynski I.; Malicka J. Fluorescence polarization standards for high-throughput screening and imaging. *BioTechniques*. 32, 34-42. 2002.
- Tõntson L.; Babina A.; Võsumaa T.; Kopanchuk S.; Rinken A. Characterization of heterotrimeric nucleotide-depleted Gα<sub>i</sub>-proteins by Bodipy-FL-GTPγS fluorescence anisotropy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 524: 93-98. 2012.
- Tõntson L.; Kopanchuk S.; Rinken A. Biarsenical ligands bind to endogenous G-protein α-subunits and enable allosteric sensing of nucleotide binding. *BMC Biochemistry*. (14):37. 2013.
- Tõntson L.; Kopanchuk S.; Rinken A. Characterization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors and their complexes with G-proteins in budded baculovirus particles using fluorescence anisotropy of Bodipy-FL-NAN-190. *Neurochemistry International*. 67: 32-38. 2014.

- Veiksina S.; Kopanchuk S.; Rinken A. Budded baculoviruses as a tool for a homogeneous fluorescence anisotropy-based assay of ligands binding to G protein-coupled receptors: The case of melanocortin 4 receptors. *BioChim Biophys Acta* 1838: 372-381. 2014.
- Weber G. Polarization of the fluorescence of macromolecules. 1. Theory and experimental method. *Biochemical Journal*. 51(2): 145-155. 1952.
- Wesolowska A.; Borycz J.; Paluchowska M.H.; Chojnacka-Wojcik E. Pharmacological analysis of the hypothermic effects of NAN-190 and its analogs, postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists, in mice. *Pol. J. Pharmacol.* 54: 391-399. 2002.
- Wong S. K. F. Radioligand binding filtration assay: Full automation. *Handbook of assay development in drug discovery*, Minor L. K. CRC Press, pp 159-172. 2006.
- Yengo C. M.; Berger C. L. Fluorescence anisotropy and resonance energy transfer: powerful tools for measuring real time protein dynamics in a physiological environment. *Current Opinion in Pharmacology*. 10: 731-737. 2010.

## Using BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S to study heterotrimeric G proteins

Annika Heinloo

### SUMMARY

G proteins are molecular switches that transmit signals from outside the cell to its interior upon ligand binding to the G protein-coupled receptor. A lot of cellular functions can be regulated through GPCR's. Because of that these proteins are a target of approximately half of medicinal drugs. G protein activation and regulation is the key element in signal transduction but studies around these signaling pathways have rather focused on GPCR's or second messengers. This study focused on G<sub>i</sub> protein regulation mechanisms. Baculovirus surface display technology was applied to coexpress serotonin 1A receptor with G protein  $\alpha$ -subunit and  $\beta\gamma$ -dimer.

One of the purposes of this thesis was to compare the binding properties of two fluorescent nucleotides: BODIPY-FL- ja BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S. It turned out that the autofluorescence of baculovirus particles is very high if excited with green light, thus it's difficult to apply green fluorescent nucleotide BODIPY-FL-GTP $\gamma$ S to study the baculovirus systems. Because of that further experiments were carried out using the red fluorescent nucleotide, BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S which gave about three times higher fluorescence signal than its analog.

It's been shown before that magnesium ions are essential in nucleotide binding to G proteins and manganese can replace magnesium in this function. In this thesis the association and dissociation kinetics of BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S were studied in the presence of both metal ions and it was found that the half times of association and dissociation did not differ from each other. Results indicated that BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S has rather slow association and dissociation to G<sub>i</sub> proteins.

In addition, 5-HT<sub>1A</sub> receptor and G protein interactions were studied. Based on first experiments, no receptor-G protein coupling was indicated upon activating the signaling pathway. Thus, the coexpression with baculovirus surface display technology should be further optimized by changing different transfection parameters.



Mina

Annika Heinloo

*(autori nimi)*

(sünnikuupäev: 17.12.1988)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

BODIPY-TR-GTP $\gamma$ S-i RAKENDAMINE HETEROTRIMEERSETE  
G $\alpha$ i-VALKUDE UURIMISEKS,

*(lõputöö pealkiri)*

mille juhendajad on Ago Rinken ning Sergei Kopanchuk,

*(juhendaja nimi)*

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **25.05.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **25.05.2015**